

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES MÉCANISMES D'ACTION
DES MÉDICAMENTS ET DES TOXIQUES

Année 1970-1971

Série E - N° 221

THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES MÉCANISMES D'ACTION DES MÉDICAMENTS ET DES TOXIQUES
DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'état)

par

Pierre BOURLIOUX

*Pharmacien-Chef des Hopitaux Psychiatriques
de la Seine*

*Maître assistant à la Faculté de Pharmacie de Paris
Lauréat de la Faculté, Lauréat des Hopitaux.*

Titre de la Thèse :

LES MITOCHONDRIES ISOLEES DU CARCINOME MAMMAIRE DU AU VIRUS DE BITTNER.
DIFFERENCES CHIMIQUES ET IMMUNOLOGIQUES AVEC LES MITOCHONDRIES ISOLEES
DES GLANDES MAMMAIRES DES SOURIS DE LA LIGNEE C₃H.

Soutenue le 2 Avril 1971

JURY : Melle le Pr LAMBIN, Président
Mr le Pr TRUHAUT, Examinateur
Mr le Pr GERMAN, "



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552011_0010

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES MÉCANISMES D'ACTION
DES MÉDICAMENTS ET DES TOXIQUES

Année 1970 - 1971

Série E - N° 221

THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES MÉCANISMES D'ACTION DES MÉDICAMENTS ET DES TOXIQUES
DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'état)

par

Pierre BOURLIOUX

*Pharmacien-Chef des Hopitaux Psychiatriques
de la Seine*

*Maître assistant à la Faculté de Pharmacie de Paris
Lauréat de la Faculté, Lauréat des Hopitaux.*

Titre de la Thèse :

LES MITOCHONDRIES ISOLEES DU CARCINOME MAMMAIRE DÛ AU VIRUS DE BITTNER.
DIFFERENCES CHIMIQUES ET IMMUNOLOGIQUES AVEC LES MITOCHONDRIES ISOLEES
DES GLANDES MAMMAIRES DES SOURIS DE LA LIGNEE C₃H.

Soutenue le 2 Avril 1971

JURY : Melle le Pr LAMBIN, Président
Mr le Pr TRUHAUT, Examineur
Mr le Pr GERMAN, "



A la mémoire de mes Parents,

A la mémoire de Benjamin De Vroemenet P. M. 1817,
professeur de Littérature à la Faculté des
Lettres d'Orléans.

Je ne publierai pas ces versets de son enseignement.

A ma famille.

A la mémoire de Monsieur le Professeur R.M. MAY,
Professeur de Zoologie à la faculté des
Sciences d'Orsay,

Nous n'oublierons pas ses conseils et son enseignement.

A Mademoiselle le Professeur S. LAMBIN,

*Professeur de Microbiologie,
Chevalier de la Légion d'Honneur,*

*qui nous a accueilli dans son service, qui nous a confié la
responsabilité des Travaux Pratiques du Certificat de Bacté-
riologie, et qui nous a fait le très grand honneur de bien
vouloir présider notre jury de Thèse,*

qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur R. TRUHAUT

*Professeur de Toxicologie,
Pharmacien-Chef des Hopitaux Psychiatriques
de la Seine,
Chef des Recherches chimiques à l'Institut
Gustave Roussy,
Membre de l'Académie des Sciences,
Membre de l'Académie de Médecine,
Commandeur de la Légion d'Honneur,*

*qui nous a fait le très grand honneur de bien vouloir juger
notre travail,*

qu'il soit assuré de notre sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur A. GERMAN,

Professeur de Virologie,

Pharmacien-Chef des Hopitaux de Paris,

*qui nous a prodigué ses conseils et ses encouragements,
qui a guidé notre entreprise, et qui nous a permis de
gravir pas à pas les échelons hospitaliers et Universitaires,*

qu'il trouve ici le témoignage sincère d'un élève reconnaissant

A Monsieur le Professeur P. TRAN BA LOC,

*Professeur de Zoologie à la faculté de Médecine
& de Pharmacie de Besançon,*

qui nous a initié à l'étude des tissus tumoraux,

qu'il soit assuré de nos vifs remerciements.

A Monsieur le Professeur R. BUVAT,

*Professeur à la Faculté des Sciences de
Marseille,
Membre de l'Académie des Sciences,*

*qui nous a initié aux techniques de microscopie électronique
dans son laboratoire de l'Ecole Normale Supérieure,*

qu'il soit assuré de notre respectueuse reconnaissance.

*A Madame F. Peter, Assistante du laboratoire de Virologie,
pour son aide et sa compétence en microscopie électronique.*

*A tout le personnel du laboratoire de Virologie, qui nous a
assisté dans les moments de découragements, et qui à su nous
apporter son aide matérielle, et son réconfort moral.*

A tous mes amis.

INTRODUCTION



Les expériences de séparation des fractions subcellulaires furent initialement réalisées par BENSLEY et par CLAUDE, entre les années 1937 et 1943 (9) (21) (22) (23) . Elles permirent de fractionner un tissu hépatique broyé dans une solution saline en :

- une fraction renfermant les noyaux et les débris cellulaires,
- une fraction renfermant les mitochondries,
- une fraction renfermant les microsomes,
- une fraction surnageante dépourvue de matériel sédimentable :
le "cell sap" anglo-saxon .

Depuis cette date, les travaux concernant les mitochondries isolées d'organes, de tissus, ou de tumeurs, se sont multipliés. Les premiers travaux mirent en évidence les principales propriétés biochimiques ; ces propriétés elles-mêmes, furent étudiées avec beaucoup de soin ; les membranes et la matrice des mitochondries furent disséquées, la microscopie électronique a apporté un certain nombre de renseignements importants dans la structure et les relations avec le milieu cellulaire , et on a commencé à s'intéresser aux acides nucléiques aux environs de 1962 .

1963 étant la date de départ de notre thèse, et les connaissances relatives à l'acide désoxyribonucléique mitochondrial étant réduites, nous avons été incité à faire une étude comparative d'un tissu tumoral animal dû à un virus et du tissu homologue sain en essayant d'utiliser les qualités particulières de finesse et d'élégance des techniques immunologiques. Nous avons fait appel, dans ce travail, au carcinome mammaire de la souris de la lignée C3H, dont on sait qu'un des facteurs de cancérisation est un virus appelé, soit agent de BITTNER, soit facteur lacté .

Il convient d'apporter quelques précisions à propos des tumeurs mammaires de la souris, car elles présentent des variations dans leurs organisations histologiques et cytologiques. APOLANT (5) a été le premier en 1906 à établir une classification des tumeurs mammaires en se basant sur l'aspect histologique. Plus récemment, DUNN (26) en 1953, propose une classification

permettant de grouper les tumeurs mammaires induites par divers moyens dans différentes lignées de souris. HOLLMAN (46) en 1968, estime que si l'on considère isolément une tumeur, les critères histologiques ne peuvent pas être retenus pour identifier la lignée de souris. Ces critères sont les suivants :

- présence ou absence de l'agent responsable de la tumeur mammaire, en fait le virus,
ou bien
- action d'agents cancérogènes chimiques ou physiques.

Toujours selon HOLMAN (46), l'organisation cytologique des tumeurs mammaires n'a pas encore été faite de façon adéquate. On n'a pas encore établi quels sont les facteurs responsables de la structure cellulaire des tumeurs de diverses origines, et on ne sait pas encore s'il existe une relation entre la différenciation cellulaire et la production de particules virales.

Les expériences effectuées in vitro et in vivo par LASFARGUES et ses collaborateurs (61) ont montré que l'élaboration de particules virales, est favorisée par la conjonction des hormones hypophysaires, ovariennes, et surrénaliennes. Or, ce sont ces mêmes hormones qui provoquent la sécrétion des cellules des glandes mammaires au repos, ou en d'autres termes, qui entraînent la différenciation cellulaire.

Du point de vue morphologiques on peut, grâce au microscope électronique, établir une distinction entre les cellules différenciées et les cellules indifférenciées, depuis que l'on dispose d'un critère de différenciation cellulaire pour les cellules sécrétrices, à savoir, le développement des organites cytoplasmiques. Plus l'ergastoplasme ou l'appareil de Golgi est développé, plus le degré de différenciation est important. La seule observation au microscope électronique ne peut malheureusement pas apporter autre chose qu'une appréciation sommaire du développement des organites intracytoplasmiques. C'est la raison pour laquelle, il faut absolument étudier le contenu de ces

organites, notamment celui des mitochondries.

Comme les tumeurs mammaires varient beaucoup dans leur organisation sub-cellulaire, il est important de les comparer avec le tissu normal, parfaitement défini du point de vue fonctionnel. Dans cette étude, nous avons fait appel à une tumeur mammaire apparaissant spontanément chez la souris de la lignée C3H. Cette tumeur est entretenue par passages successifs sur les souris de mêmes lignées, au moyen de la technique de transplantation tumorale. Elle est obtenue par greffe et elle n'est pas sécrétrice. Il est donc important que l'étude comparative soit faite sur des glandes mammaires au repos (non sécrétrices). Ce sont des glandes mammaires de ce type qui nous ont servi de tissu sain.

La structure cellulaire de la glande mammaire normale a été décrite par WELLINGS (97) en 1960, par BARGMAN (7) en 1961, par HOLLMAN (45) en 1962. Sur les microphotographies, la glande mammaire montre un remarquable développement des organites cellulaires, lié à la synthèse protéique et à la synthèse lipidique particulièrement actives à ce niveau. Le noyau est sphérique ou ovoïde et renferme un ou plusieurs nucléoles proéminents. La région basale et paranucléaire de la cellule est occupée par un ergastoplasme très élaboré, qui est formé de rangées parallèles de "cisternae". Les mitochondries sont nombreuses et réparties au hasard. Un appareil de Golgi bien développé est situé dans la région supra-nucléaire de la cellule ; il est formé de larges vacuoles, de petites vésicules, et de rangées parallèles de fines membranes. Le produit de sécrétion apparaît en partie comme structure visible, sous forme de granules protéiques ou de gouttelettes lipidiques. Les granulations protéiques sont formées dans les vacuoles de l'appareil de Golgi, et les gouttelettes lipidiques apparaissent entre les rangées parallèles de l'ergastoplasme. Le produit de sécrétion est libéré dans la lumière de l'acinus de sorte qu'aucun phénomène de stase ne se produit à l'intérieur de la cellule (vois Schéma n° 1 emprunté à Hollman) .



SCHEMA n° 1

Dessin schématique montrant une cellule de glande
mammaire en état de lactation . D'après HOLLMAN .

La structure cellulaire de la tumeur mammaire, qu'elle soit sécrétrice ou non, présente une organisation sub-cellulaire beaucoup moins importante, et comme nous le verrons plus loin, dans la conclusion de la première partie, le nombre des mitochondries, ainsi que le volume occupé dans le cytoplasme sont beaucoup moins importants. Les particules virales sont situées essentiellement au niveau de l'appareil de Golgi. (voir Schéma n° 2 et Schéma n° 3 empruntés à Hollman) .

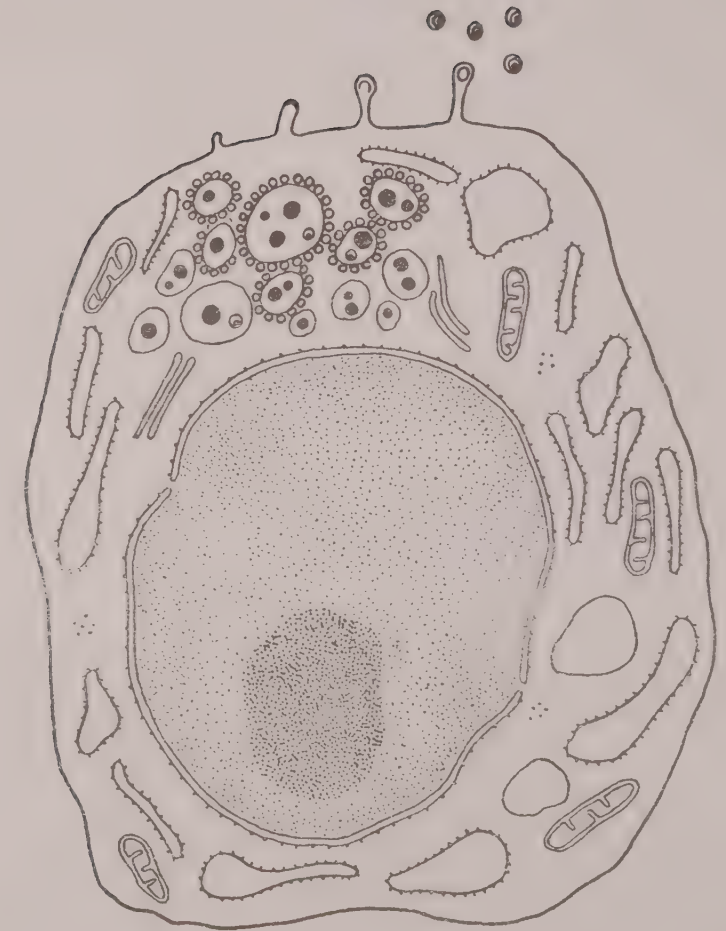
Avant de considérer le rôle des mitochondries dans la cellule, il convient de rappeler brièvement leur nature. Il s'agit d'un petit organe intra-cellulaire, de forme ovoïde ou allongé, qui mesure dans le sens de la longueur entre 10.000 et 20.000 Å, et dans le sens de la largeur environ 5.000 Å .

Du point de vue structural, il est formé par deux membranes séparées entre elles par un fluide aqueux. La membrane interne comporte de nombreux replis donnant naissance à des formations semblables à des sacs allongés appelés "cristae" ou crêtes. Le liquide aqueux maintient les membranes en communication entre elles ; il est aussi le véhicule des enzymes et co-enzymes nécessaires aux différentes réactions biochimiques qui se déroulent dans la mitochondrie .

Le matériau est représenté, pour les 4/5, par une protéine de structure, et pour le 1/5 restant, par des Phospholipides. La surface des deux membranes est recouverte de très nombreuses particules sphériques. C'est précisément dans ces particules que se trouvent les complexes destinés au développement des activités biochimiques de la mitochondrie.

Le rôle principal des mitochondries est d'assurer pour la cellule, trois fonctions de base à savoir :

- 1) Exécution de réactions oxydatives capables de fournir des électrons.



SCHEMA n° 2

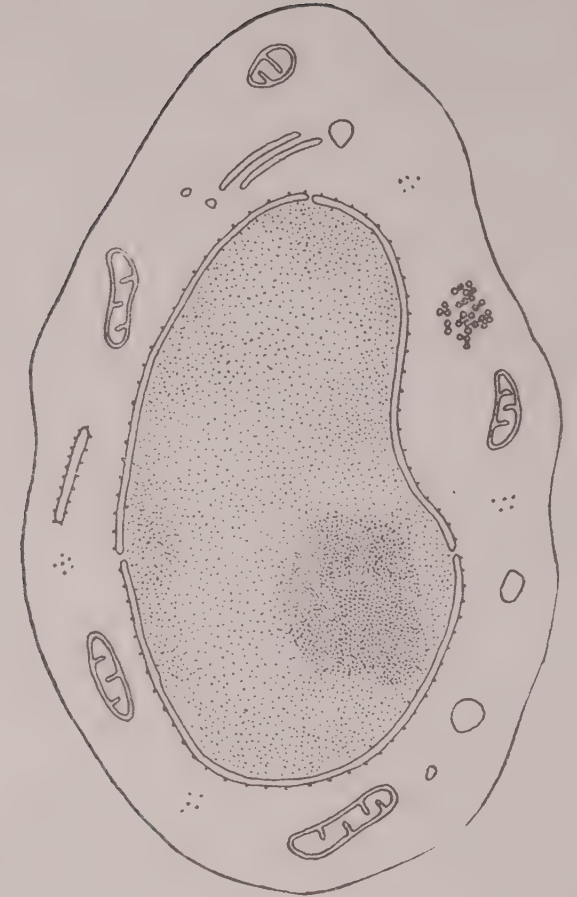
Dessin schématique montrant une cellule
tumorale sécrétrice . D'après HOLLMAN .

- 2) Transport des électrons libérés, le long d'une chaîne enzymatique conduisant à la formation d'Adenosine Tri Phosphate que l'on a coutume d'appeler A.T.P.
- 3) Réalisation des réactions de synthèse qui peuvent être rendues possibles par l'énergie apportée par cet A.T.P.

Du point de vue topographique, les particules qui remplissent la première et la troisième de ces fonctions, se trouvent au niveau de la membrane externe. La chaîne de transfert des électrons qui mène à la synthèse de l'A.T.P. siège au niveau de la membrane interne. La fonction essentielle des particules vouées au transport des électrons, est de former de l'A.T.P. par l'union d'un atome de phosphore à l'Adenosine Di Phosphate ou A.D.P. grâce à une liaison de haute énergie. L'énergie nécessaire à la formation de cette liaison est due à une chute de potentiel produite lors du passage des électrons d'un complexe à l'autre. La topographie des complexes I, II, III, IV, est représentée dans le Schéma n° 4 emprunté à D.E.GRENN en 1964.

Les électrons fournis par le cycle de Krebs, qui se déroule dans les particules situées sur la membrane externe, sont véhiculés par le Di Phospho Pyridine Nucléotide, ou D.P.N. jusqu'au complexe I.

Quant à l'autre vecteur et toujours à partir des particules situées sur la membrane externe, c'est le succinate, qui passe par un intermédiaire différent et transporte les électrons directement au Complexe II. A partir de ce moment, le trajet devient commun et les deux parcours se rejoignent au niveau du Complexe III et se confondent pour atteindre le dernier, le Complexe IV. C'est là que prend fin le voyage des électrons qui, après avoir été transportés le long de la chaîne respiratoire constituée par la série des molécules "transporteurs", s'unissent pour finir à l'oxygène. Pendant ce parcours, les électrons ont cédé progressivement l'énergie nécessaire à la synthèse de l'A.T.P. Maintenant, l'organisme dispose de l'énergie utile pour faire fonctionner biologiquement, les tissus et organes qui en ont besoin. (L'hydrolyse de la troisième molécule d'acide phosphorique de l'A.T.P. libère environ 10.000 calories). Dans la chaîne enzymatique de transport qui



SCHEMA n° 3

Dessin schématique montrant une cellule
tumorale non sécrétrice. D'après HOLLMAN.

mène du D.P.N. à l'oxygène, trois étapes peuvent permettre chacune une phosphorylation.

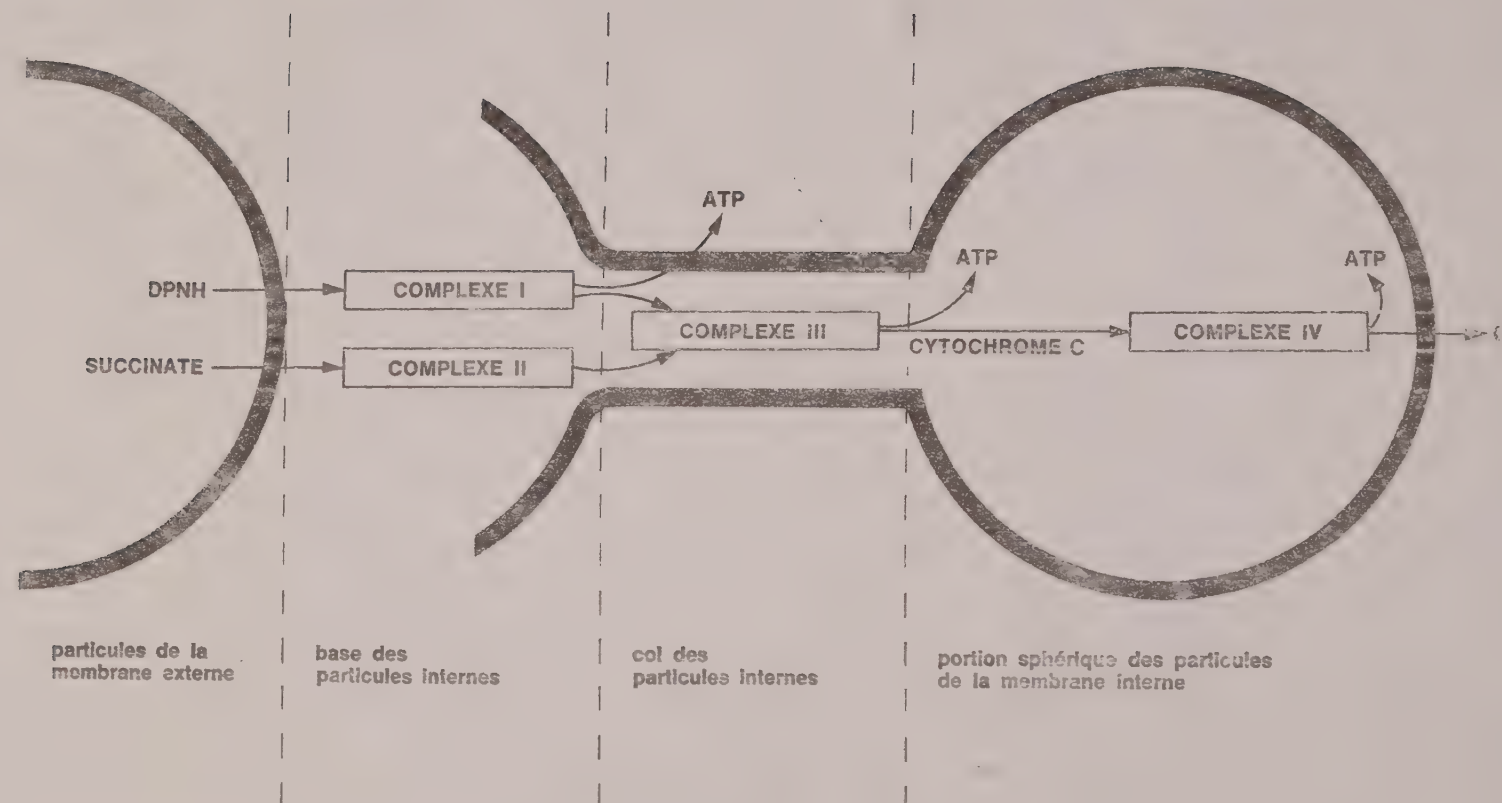
- La première est celle de la réduction d'une flavoprotéine
- La seconde est celle du passage de la flavoprotéine réduite au cytochrome "c" .
- La troisième est celle du passage du cytochrome "c" à la cytochrome oxydase.

Actuellement, les travaux de GREEN nous permettent de mieux comprendre ces phénomènes. Dans chaque particule de la membrane mitochondriale interne, les électrons traversent une série de onze catalyseurs susceptibles d'être aussi bien oxydés que réduits et disposés selon une séquence précise en quatre complexes. Chaque complexe est comparable à une sorte de noix, la coque étant faite de protéines (4 à 6 molécules) , l'amande étant représentée par des phospholipides. Les protéines sont liées entre elles et aux phospholipides par des ponts hydrophobes.

Les complexes I et II forment un tandem, le complexe I recevant les électrons fournis par le D.P.N.H. (D.P.N. réduit), et le complexe II, redevant ceux donnés par le succinate, produit intermédiaire du cycle de Krebs. Du transfert d'une paire d'électrons, du D.P.N.H. au complexe I, résulte la formation d'une molécule d'A.T.P. De même, une molécule d'A.T.P. se forme lors du transport d'une paire d'électrons, soit du complexe I au complexe III soit du complexe III au complexe IV .

A la sortie des complexes I et II, les électrons traversent une couche lipidique dite couche du Co-enzyme "Q". Lorsqu'ils quittent le complexe III, ils sont véhiculés par le cytochrome "c" .

Ce rôle de fournisseur d'énergie, par l'intermédiaire de l'A.T.P. est fondamental. Il est vraiment le rôle vital rempli par ces organites intracellulaires. Il prend de plus en plus d'importance depuis que l'étude des mitochondries, au cours de certaines maladies métaboliques, a



SCHEMA n° 4 Schéma de la production d'A.T.P. au niveau des mitochondries

D'après D.E. GREEN

"The role of lipids in mitochondrial electron transfer and oxidative phosphorylation"

Biochim.Biophys.Acta. 1963 , 70 , p.554-582

permis de prouver qu'elles étaient responsables de désordres organiques pouvant faire penser à des maladies connues comme l'hyperthyroïdie, mais pour lesquelles le traitement était resté inefficace .

Le second rôle des mitochondries découle du premier. Après avoir fabriqué de l'A.T.P. , il faut le fournir aux autres composants cellulaires pour que l'énergie serve aux synthèses.

Le troisième rôle est un rôle de stockage, qui varie avec les tissus d'où proviennent les mitochondries.

En fait, il semble bien que le rôle physiologique des mitochondries se borne à cela. Cependant, il y a eu, ces dernières années, un certain nombre de découvertes. C'est ainsi que l'on a d'abord trouvé des acides Ribonucléiques, acides indispensables aux synthèses protéiques, et également les acides Désoxyribonucléiques qui sont en fait, le support de l'hérédité. En fait, ce dernier l'A.D.N. est intéressant à de très nombreux points de vue.

1) Tout d'abord, on sait depuis longtemps que les mitochondries au cours de la mitose , sont capables de se reproduire ; elles s'émettent en granules, d'où naissent vraisemblablement autant de nouveaux éléments. Cet A.D.N. mitochondrial y joue-t-il un rôle ?

2) Ensuite, on sait que les mitochondries, au sein des cellules ont des rapports directs avec le noyau, comme l'ont montré en 1952, FREDERIC et CHEVREMONT en étudiant les fibroblastes de poulet. Cet A.D.N. mitochondrial a-t-il un quelconque rapport avec l'A.D.N. nucléaire ?

3) Enfin, dernier point important, si les mitochondries renferment de l'A.D.N. , comme le prouvent soit l'action de l'A.D.Nase, soit l'incorporation de la thymidine tritiée et autoradiographie, peut-il avoir un rôle dans le processus de la cancérisation ?

Le point peut-être le plus important décelé ces dernières années et relatif à l'A.D.N. mitochondrial, réside dans le fait qu'il a été trouvé sous une forme circulaire, forme retrouvée dans les bactéries et les virus .

Le but de notre travail a été de faire l'étude comparative des mitochondries de la tumeur mammaire greffée de la souris de la lignée C3H, et de celles des glandes mammaires saines non sécrétrices .

La première partie de ce travail, revêt une certaine importance car nous nous sommes heurtés au départ, à un problème d'extraction et d'isolement des mitochondries. Les difficultés sont d'ordre différent selon qu'on pense au substrat ou à la technique.

- 1) Les souris de la lignée C3H ne sont pas très faciles à obtenir : le seul fournisseur étant le centre d'élevage du C.N.R.S. primitivement situé à GIF S/YVETTE et maintenant implanté à ORLEANS .
- 2) Les essais d'élevage que nous avons tentés, se sont révélés infructueux, du fait :
 - que les portées étaient numériquement faibles
 - que les souriceaux mouraient dans une forte proportion.
 - que les souriceaux femelles étaient en bien moins grand nombre que les souriceaux mâles .

Nous avons donc adopté le système de l'abonnement mensuel.

- 3) La tumeur utilisée, est une tumeur spontanée, greffée régulièrement aux souris femelles de même lignée. Il a donc fallu

utiliser, comme témoin, les souris non atteintes de tumeur. Or, les glandes mammaires de souris au repos, si l'on fait abstraction de la graisse qui les entoure, sont très petites, et il faut beaucoup de matériel animal, pour n'obtenir que de très petites quantités de mitochondries.

- 4) Si l'extraction des mitochondries tumorales n'est pas trop complexe, car il s'agit, en fait, d'un tissu à croissance rapide, il n'en a pas été de même pour les glandes mammaires. En effet, ces dernières sont entourées de tissu adipeux, et le broyage et les centrifugations différentielles sont très difficiles à effectuer. Il nous a fallu créer de toutes pièces une technique qui permette un rendement matériel cellulaire, et donc en mitochondries, particulièrement important.

La seconde partie de ce travail est consacrée à l'étude comparative du contenu mitochondrial, après rupture de la membrane et solubilisation des protéines au moyen de solutions de détergents. L'étude chimique et électrophorétique a déjà été publiée (14).

La troisième partie de ce travail est le complément de la partie précédente. En effet, nous avons voulu essayer de mieux mettre en évidence la différence que nous avons notée à l'électrophorèse, en utilisant pour cela les méthodes immunologiques.

P R E M I E R E P A R T I E

EXTRACTION DES MITOCHONDRIES DE LA TUMEUR MAMMAIRE
ET DES GLANDES MAMMAIRES NORMALES .

A) I N T R O D U C T I O N

A quoi correspond le carcinome mammaire de la souris de la lignée C3H ? Quels en sont les agents causals ? Quels sont les éléments intervenant dans le processus tumoral ? Les réponses à ces questions doivent nous permettre de voir plus clair dans l'étude que nous nous proposons de faire .

Pendant longtemps, et cela jusqu'en 1935, les seuls processus tumoraux dûs à des virus que l'on connaissait, étaient : la leucémie aviaire, et le sarcome aviaire. C'est à partir de 1936 que commença, avec la découverte du premier virus dans une tumeur chez un mammifère, l'étude approfondie des tissus tumoraux. Ce premier néoplasme était le carcinome mammaire de la souris longtemps attribué à l'hérédité seule, dont LACASSAGNE découvrit l'origine hormonale, et dont BITTNER prouva l'origine virale. Il faut ajouter pour bien comprendre ce qui va suivre, que BITTNER faisait partie de l'équipe de LITTLE, qui créa en 1909, les premières lignées pures de souris.

L'origine de la découverte de BITTNER (11) repose sur une expérience portant sur une lignée pure de souris, la lignée C3H. Dans son laboratoire, on éleva plusieurs lignées pures de souris de ce type. Certaines avaient pour caractère principal, une fréquence très élevée en carcinomes mammaires. Dans d'autres lignées, on n'observait jamais de telles tumeurs. Un jour, plusieurs femelles des deux lignées mirent bas simultanément, et BITTNER eut l'idée d'échanger la progéniture des deux catégories de mères. Ainsi, les souriceaux de la lignée cancéreuse furent allaités par la mère de la lignée à faible incidence de cancer, et inversement .

Les résultats de cette expérience furent absolument surprenants. En effet, les souris femelles de la lignée non cancéreuse, mais ayant reçu du lait de la mère provenant de la lignée à forte incidence de cancer moururent presque toutes avec des cancers mammaires. Par contre, celles qui auraient dû normalement avoir des tumeurs, n'en eurent jamais , tout se passant comme si le lait de la mère appartenant à la lignée de faible incidence de cancer, avait protégé ces animaux contre la maladie.

Ces expériences prouvèrent donc qu'il existe quelque chose dans le lait des femelles appartenant aux lignées cancéreuses, qui possède des propriétés cancérigènes pour les glandes mammaires de souris. Dans les premières publications relatives à cette question, on prononça même le mot de virus. Mais il fallu attendre une dizaine d'années pour qu'il soit prouvé que "l'agent de BITTNER" ou "facteur lacté" est bien un virus authentique. Ce virus a été isolé des tumeurs et du lait. Il a été particulièrement bien étudié. C'est un virus à A.R.N. Nous verrons plus loin les précisions qui concernent sa structure et ses propriétés. En ce qui concerne son mode d'action dans le processus de la cancérisation, deux théories se sont affrontées.

La première est la thèse virologiste. Les partisans de cette thèse estiment que l'agent de BITTNER est un facteur indispensable à la genèse des cancers mammaires. La transformation de la cellule normale en cellule cancéreuse est, disent-ils, uniquement dépendante de l'action du virus spécifique. Cette thèse faisant intervenir le seul virus, semble insuffisante comme nous le verrons plus loin .

La seconde est la thèse biologique, qui pourrait être d'ailleurs qualifiée plus justement d'endocrinologique. Les partisans de cette thèse estiment que le virus n'intervient pas de manière décisive dans la carcinogénèse. En effet, ce virus n'est pas cancérigène pour les souris mâles, sauf pour celles qui reçoivent en même temps un traitement par les hormones oestrogènes. En outre, il est possible de provoquer à l'aide d'une stimulation hormonale adéquate, des cancers mammaires chez des souris que l'on sait être exemptes de virus. Cette thèse endocrinologique était avancée bien avant la découverte de l'agent de BITTNER, et elle est due principalement aux travaux de LACASSAGNE (58). Les premières hormones incriminées étaient celles qui participent à la vie génitale, c'est-à-dire les oestrogènes. Mais en fait il faut aller plus loin et considérer que les hormones ovariennes sont sous la dépendance de l'hypophyse (59) qui sécrète des hormones régulatrices de la production des hormones ovariennes. On est parvenu à isoler l'hormone hypophysaire qui intervient le plus fortement

dans la carcinogénèse mammaire , il s'agit de la "prolactine" encore appelée "hormone mammogène" . Il convient de souligner que cette hormone n'agit pas directement en tant qu'agent cancérigène, mais par l'intermédiaire des produits ovariens qu'elle fait sécréter, c'est à dire essentiellement : les oestrogènes . Une preuve indirecte en a été apportée par la thérapeutique appliquée au cancer mammaire chez la femme. On utilise pour combattre les effets des oestrogènes, l'hormone physiologiquement antagoniste, c'est à dire l'hormone mâle ou testostérone. Mais l'action unique de ces hormones ne suffit pas à combattre la maladie et à amener la guérison. On peut néanmoins noter le plus souvent, une régression temporaire ; dans quelques cas cependant, aucune régression n'est observée, alors qu'il est constaté un comportement très différent de celui auquel aboutit le traitement habituel. Les causes de cette différence d'action ne commenceront à s'éclaircir qu'avec les travaux de FURTH (32) . Au cours de ses travaux sur différents cancers de souris provoqués par des hormones, cet auteur remarque que certaines tumeurs qui paraissent être des cancers véritables et caractéristiques, peuvent régresser spontanément si on supprime le traitement hormonal, alors que dans d'autres tumeurs la régression ne se fait pas, et la tumeur continue de se développer. Il désigna ces deux sortes de tumeurs par les termes "dépendants" et "autonomes". Nous reviendrons sur ces termes à la fin de ce travail .

Nous voyons donc, avec ce rappel très succinct, que le problème de la carcinogénèse est complexe, et non encore résolu. Nous devons ajouter, à la présence du virus et à l'action des hormones, un élément important qui est l'environnement cellulaire et plus précisément la spécificité tissulaire. A partir du moment où le processus tumoral est enclenché, la cellule atteinte perd sa notion d'ordre au sein du tissu et n'obéit plus normalement aux incitations hormonales ou tissulaires, pour proliférer de manière anarchique. C'est donc que l'environnement direct de la cellule n'a plus d'influence directe sur sa croissance et sa régulation. On peut donc penser que le processus tumoral a fait perdre à la cellule ce que nous appellerons son "gène de régulation" .

C'est volontairement que nous employons ce terme de gène, car en fait, tout repose sur le système génétique de la cellule. L'information que contient l'A.D.N. et qui est destinée à assurer la vie et la multiplication

des cellules, et par suite celles des tissus, subit des modifications au cours de la cancérisation et c'est un point sur lequel nous reviendrons à la fin de ce travail car il nous semble primordial .

Comment considérer alors le rôle du virus ? Les trois facteurs, génétique, hormonal et viral, participent au phénomène de la cancérisation. Il a été montré par de nombreux auteurs comme ANDERVONT, DUNN, BITTNER, BOOT, MUHLBOCK, et DMOCHOWSKI que le virus seul n'est pas essentiel à la production de tous les cancers mammaires de la souris, car il existe de nombreuses expériences effectuées par ces auteurs dans lesquelles la cancérisation a été obtenue chez des lignées de souris exemptes de virus. C'est ce fait qui rend la recherche des virus des tumeurs très difficile , car ils peuvent jouer un rôle mineur dans les interactions complexes des diverses influences qui aboutissent au néoplasme.

Pour tenter d'expliquer cette absence de virus, on a envisagé sa présence sous la forme d'un virus latent. Cette solution peut être valable surtout si on se rappelle que la découverte de BITTNER était due au fait qu'il s'était adressé à des lignées pures de souris, et qu'il avait sélectionné les lignées à haute incidence et les lignées à faible incidence de cancers. Le problème est donc légèrement faussé au départ, car on a tendance à oublier facilement que les expériences ont été réalisées sur des animaux sélectionnés. La principale raison que nous avons de souligner ce point, est d'attirer l'attention sur le fait que le phénomène d'apparition ou de disparition du virus arrive rarement dans les élevages de souris. On n'est pas loin de penser à l'heure actuelle que la découverte d'un virus dans le carcinome mammaire a été rendue possible par l'utilisation des lignées pures de souris patiemment sélectionnées et élevées. Les recherches effectuées par différents auteurs comme DUNN ou ANDERVONT , sur des souches de souris sauvages, ont contribué à donner plus de poids à cette hypothèse.

Quels sont les caractères et les propriétés du virus de la tumeur mammaire de la souris, que nous appellerons V.T.M. , et que les auteurs anglo-saxons appellent M.T.V. (Mammary Tumor Viruse) .

Il s'agit comme nous l'avons déjà dit d'un virus à A.R.N. A l'intérieur de la tumeur, on a pu distinguer au microscope électronique deux types de particules virales : particules "A" et particules "B" qui selon BERNHARD et ses collaborateurs, (10) correspondent à deux stades de développement du virus .

Les particules "A" ont un diamètre de 65 à 70 mμ , et on les retrouve particulièrement à la limite nucléo-cytoplasmique, en rapport étroit avec l'appareil de Golgi. Elles renferment un nucléotide et sont entourées par une membrane simple ou double. On peut les trouver disposées autour de petites vacuoles .

Les particules "B" sont plus grandes, et mesurent environ 130 mμ . Elles se trouvent à l'intérieur des conduits de la glande mammaire infectée. Elles représentent la forme définitive du virus et proviennent des particules "A" .

Ce virus peut donner naissance à des anticorps neutralisants chez le lapin et chez le cobaye, mais pas chez la souris. On a décrit également des anticorps précipitant et fixant le complément. Cependant BROWN et BITTNER (17) estiment que ces derniers anticorps n'apportent rien d'important, et qu'il vaut mieux rechercher, par la technique des anticorps fluorescents, le pouvoir protecteur du sérum, empêchant le virus d'entrer dans la cellule .

La culture en oeuf s'est toujours révélée négative. En culture de tissu on peut maintenir le virus en survie, en utilisant comme cellules, les fibroblastes de peau d'embryon de souris. Seul, PIKOWSKI (77) a publié une multiplication du virus en le cultivant sur des fibroblastes d'embryon de poulet. Mais cela n'a jamais été confirmé.

Nous avons rappelé, dans l'introduction générale, les notions succinctes concernant les mitochondries, et dans l'introduction de cette première partie, les notions fondamentales relatives au carcinome mammaire de la souris. Pourquoi étudier comparativement les mitochondries du carcinome mammaire et celles des glandes mammaires des souris de même lignée ? Il y a à cela plusieurs raisons :

- La première réside dans le fait que ce travail est avant tout un travail d'immuno-virologie, et qu'il devait s'adresser à une tumeur animale due à un virus.
- La seconde, parce que s'il a été comparé des tissus sains et leurs homologues tumoraux, il n'a jamais été utilisé comme substrat de travail, le carcinome mammaire comparé au tissu sain homologue, en dehors des études histologiques au microscope électronique. Il est vraisemblable que bon nombre d'auteurs ont reculé devant l'importance du travail à réaliser pour récupérer les mitochondries isolées des glandes mammaires saines de souris.
- La troisième raison trouve sa justification dans le fait que relativement peu d'études immunologiques ont été entreprises au sujet des mitochondries, que l'on sait être aujourd'hui, des organites intracellulaires jouissant d'une certaine indépendance au sein de la cellule, et disposant d'un matériel génétique et d'un système propres leur permettant de se repliquer et d'effectuer, sans aucune aide extérieure, une synthèse protéique.

Enfin, ce sujet nous permet de toucher intimement au mécanisme cellulaire, et nous permettra peut-être de mieux comprendre le mode d'action d'un virus dit "oncogène" au sein d'une cellule qui renferme dans des organites nommés mitochondries, un acide nucléique dont la taille et la forme rappellent de façon très précise les acides nucléiques bactériens et surtout viraux.

Le premier substrat à utiliser dans ce travail est la mitochondrie isolée. Comment l'extraire ?

B) EXTRACTION DES MITOCHONDRIES DES GLANDES MAMMAIRES ET DE LA
TUMEUR MAMMAIRE DE LA SCURIS DE LIGNEE C₃H .

GENERALITES

Comme nous l'avons dit au début de ce travail, ce sont BENSLEY et CLAUDE (9) (21) (22) (23) qui ont réussi les premiers à fractionner un tissu hépatique dans une solution saline .

Mais le fractionnement des cellules en solution saline se complique par la tendance des granules à s'agglomérer et à sédimenter en grumeaux. Cette tendance peut être abolie en utilisant comme milieu de dispersion pour les mitochondries une molécule apolaire comme le saccharose. HOGEBOOM, SCHNEIDER, et FALLADE (43) utilisèrent le saccharose 0,88 M. Les mitochondries conservent dans un tel milieu, leurs caractères morphologiques de bâtonnets. Cependant, à cette concentration en saccharose, la viscosité et la densité du milieu sont telles que l'on est obligé d'employer des vitesses de centrifugation très grandes, pour sédimenter les différentes fractions cellulaires.

La pratique moderne consiste à utiliser, comme milieu de dispersion, une solution de saccharose 0,25 M, qui permet d'éviter l'aggrégation des granules. Les mitochondries ainsi isolées ont les mêmes propriétés biochimiques que celles obtenues dans une solution de 0,88 M de saccharose, bien qu'elles soient de forme sphérique plutôt qu'allongée.

Pour éviter ce gonflement des mitochondries, on ajoute au saccharose 0,25 M, des substances qui inhibent le gonflement des particules. L'étude des facteurs intervenant dans ce processus a été faite par WITTER et COTTONE (99). De cette étude il ressort que ;

- l'A.T.P. , l'éthylène diamino tétracétate, le citrate, inhibent le gonflement qui se produit dans le saccharose 0,25 M
- alors que les phosphates et le succinate, au contraire, accélèrent le processus.

D'autre part, WERKHEISER et BARTLEY (98) préconisent l'utilisation de Dextran à 6% ou de Polyvidone à 7,3 %, pour obtenir des préparations de mitochondries exemptes de microsomes. De plus, ces auteurs conseillent d'utiliser pour la dissolution de ces produits, une eau distillée privée de gaz carbonique par ébullition pendant quelques minutes.

Enfin, le pH de la solution finale doit être ajusté à 7,8 avec une solution 0,2 M de Tris (Hydroxy-méthyl) amino méthane. Il semble en effet d'après WITTER et COTTONE (99) et d'après HAWTREY et SILK (41) que la stabilité des particules dépendent plus de ce facteur que de la concentration en saccharose.

I - LES MITOCHONDRIES PROVENANT DE LA TUMEUR

1 - La Tumeur mammaire -

De nombreuses études ont été faites par divers auteurs sur le facteur lacté (Virus de BITTNER) agent causal du carcinome mammaire de la souris de lignée C₃H . (13) (12) (64) (69).

Par contre, les mitochondries des cellules tumorales de ce carcinome ne font pas encore l'objet d'études approfondies. Dans ce travail, nous avons utilisé une tumeur mammaire spontanée, greffée sur les souris femelles de même lignée provenant de l'élevage du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette et, depuis quelques mois, du centre d'élevage du C.N.R.S. à Orléans .

a) Méthode de greffe de la tumeur -

La tumeur est prélevée stérilement sur une souris atteinte du carcinome. Elle est placée dans une boîte de Pétri stérile, renfermant quelques millilitres de sérum physiologique stérile. Elle est finement découpée à l'aide de ciseaux à bouts recourbés.

La greffe s'effectue par injection sous cutanée, sur la face ventrale des souris, en suivant l'axe mammaire, à l'aide d'un trocard suffisamment gros pour permettre le passage des fragments tumoraux. L'injection se fait de bas en haut en opérant de telle sorte que le trocard soit enfoncé depuis le niveau des pattes postérieures, jusqu'à celui des pattes antérieures. On ne commence à appuyer sur le piston de la seringue que lorsque l'aiguille est au niveau des pattes antérieures. Il suffit alors de retirer lentement l'aiguille en même temps que l'on appuie sur le piston de la seringue. La quantité injectée est de 0,5 ml par coté, soit 1 ml par souris.

b) Développement de la tumeur greffée

Les souris sont placées ensemble, à raison de 10 par cage et sont régulièrement surveillées. La croissance tumorale s'observe en général au bout des huit premiers jours qui suivent l'injection. La croissance est maximum au bout de quatre semaines. Il n'y a pas intérêt à laisser les souris survivre plus longtemps, sinon la tumeur se nécrose et s'infecte, et il devient impossible de les utiliser. Les souris sont donc sacrifiées à la quatrième semaine, et sont tuées par dislocation bulbaire.

c) Conservation de la tumeur

Lors de l'autopsie des souris greffées, il a toujours été procédé à la séparation des tumeurs prélevées en trois lots, quand la quantité le permettait.

- le premier lot, constitué par une grosse tumeur ou par plusieurs petites, sert à la greffe de nouvelles séries de souris

- Le deuxième lot, représentant environ 50 % des tumeurs restantes, est soit utilisé immédiatement pour l'étude des mitochondries, soit placé à -20°C , dans un récipient stérile, pour une utilisation rapide dans les jours qui suivent.
- Le troisième lot, représentant environ 50% des tumeurs restantes, est placé au congélateur entre -70 et -80°C dans un récipient stérile, pour une utilisation plus tardive.

d) Homogénéisation de la tumeur

Pour séparer par centrifugation différentielle les fractions sub-cellulaires, et obtenir des particules aussi intactes que possible au point de vue morphologique, il est nécessaire d'opérer dans un homogénéiseur du type POTTER-ELVEHJEM (79), muni d'un piston en teflon ou en verre rodé. Enfin, pour opérer dans les meilleures conditions, il convient de préparer un homogénat à 10 % (p/v).

La technique d'homogénéisation a été la suivante :

- Pesée de la tumeur mise en expérience (poids humide)
- Découpage de la tumeur en fragments le plus fin possible de manière à obtenir un homogénat grossier, en utilisant comme solution isotonique la solution suivante :

SACCHAROSE 0,25 M	85 g
DEXTRAN 6%.....	60 g
ou (E.D.T.A. (Complexon III) 0,001 M).....	0,186 g
(CITRATE TRISODIQUE 0,001 M	0,178 g
TAMPON TRIS 0,2 M	Q.S.P. pH 7,6
EAU DISTILLÉE PRIVÉE DE CO ₂	Q.S.P. 1000 ml

Cette solution est ensuite stérilisée par filtration et conservée à + 4° C .

Lorsque nous parlerons de la solution de saccharose 0,25 M dans les pages qui suivent, ce sera toujours de la solution précédente qu'il s'agira .

- Homogénéisation proprement dite .

L'homogénéisation est réalisée dans un homogénéisateur de POTTER à piston en téflon, ce dernier étant entraîné par le moteur électrique d'un agitateur "JOUAN" tournant au maximum à 3.000 tours par minute. L'homogénat final est à 10% (p/v). Toutes ces opérations doivent être menées le plus stérilement possible, et à une température voisine de + 4° C.

2 - Obtention des mitochondries provenant de la tumeur -

L'homogénat précédent, est soumis à la centrifugation différentielle, dans une centrifugeuse "SPINCO" type "L", à une température comprise entre + 2° et 4° C .

Les vitesses de centrifugation utilisées le plus couramment pour l'obtention des mitochondries sont les suivantes :

- Sédimentation préalable des noyaux et des débris cellulaires au moyen d'une vitesse de centrifugation comprise entre 600 et 1.200 "g" .
- Puis sédimentation des mitochondries au moyen d'une vitesse de centrifugation comprise entre 7.500 et 14.000 "g".

Ces valeurs extrêmes relevées dans la littérature concernent différents tissus : foie, coeur, muscle, cerveau, thyroïde, rein, tumeur, leucocytes etc...

Ce qui est le plus à craindre au cours de la centrifugation est la contamination par les microsomes, la "Fluffy layer" des auteurs Anglo-Saxons. Pour éliminer cette couche duveteuse, riche en phospholipides et en acides ribonucléiques, en plus de l'emploi de Dextran de P.M. 40.000, deux types de techniques sont utilisables :

Première technique utilisable : Certains auteurs comme SINGH et collaborateurs (84) font sédimenter les mitochondries par centrifugation à une accélération de 10.000 "g" pendant 15 minutes, puis ils éliminent la couche duveteuse, en reprenant ce premier culot de mitochondries par du saccharose 0,25 M et en le centrifugeant à l'accélération de 8.000 "g" pendant 15 minutes et cela cinq fois de suite .

Deuxième technique utilisable : D'autres auteurs comme HAREL et ses collaborateurs (40) séparent les mitochondries de foie de rat en les soumettant à une accélération de 8.500 "g" pendant 10 minutes. Le culot ainsi obtenu est lavé une première fois avec la solution de saccharose 0,25 M, et centrifugé à nouveau à 8.500 "g" pendant 10 minutes. Le deuxième culot obtenu présente deux couches concentriques, l'une jaunâtre, bien collée au fond du tube, l'autre rosée, à peine adhérente à la surface de la première couche . Cette deuxième couche, qui est la couche légère, repasse facilement en suspension. lorsqu'on agite le tube renfermant encore quelques millilitres de surnageant, alors que les mitochondries restent fermement collées au fond du tube . Après élimination de cette couche légère, un troisième lavage et une troisième centrifugation à 8.500 "g" pendant 10 minutes donnent un culot de mitochondries pures .

En réalité, ces deux techniques se ressemblent, car si on estime à 10% environ la proportion de la couche duveteuse sédimentée avec le premier culot de mitochondries, ce taux se trouve ramené à 1% après un premier lavage et une première centrifugation ; un second lavage et une seconde centrifugation ramènent ce taux à 0,1 % ; après une troisième opération, on ne retrouve plus qu'un taux de microsomes de l'ordre de 0,01 % . Donc au total dans les deux cas, on peut considérer qu'il ne reste plus de microsomes dans les préparations.

Mais c'est la seconde technique que nous avons utilisée dans cette étude, car elle permet d'obtenir le plus grand rendement en mitochondries. En effet, dans la première technique, le fait de diminuer la vitesse de centrifugation, et de passer de 10.000 à 8.000 "g", a pour conséquence une perte non négligeable de mitochondries. Or, la rareté du matériel utilisé, nous a obligé

à tenir compte de l'économie rendue possible par l'emploi de la seconde technique.

L'homogénat provenant de la tumeur est d'abord soumis à une centrifugation de 1.000 "g" pendant 20 minutes. Le surnageant est décanté et mis de côté dans un récipient stérile à + 4° C: soit S_1 .

Le culot de cellules et débris cellulaires est repris par moitié moins de la solution de saccharose qu'il en a fallu pour préparer l'homogénat de départ. Cette suspension est à nouveau soumise à l'action de l'homogénéiseur de POTTER, puis centrifugée à + 4° C à l'accélération de 1.000 "g" pendant 20 minutes. Le surnageant soit S_2 est réuni au surnageant S_1 . Le culot de débris cellulaires est éliminé définitivement.

Les surnageants S_1 et S_2 sont alors soumis à une centrifugation à l'accélération de 10.000 "g" pendant 30 minutes. On obtient ainsi un premier culot M_1 , qui représente le premier culot brut de mitochondries. Le surnageant est éliminé, et le culot M_1 est repris par la solution de saccharose, soumis à l'action de l'homogénéiseur de POTTER, et centrifugé à nouveau à 10.000 "g" pendant 30 minutes. Lors de cette deuxième centrifugation, on peut noter la présence d'une couche légère que l'on élimine facilement. Enfin le deuxième culot soit M_2 , est repris par la solution de saccharose, et à nouveau soumis à une centrifugation pendant le même temps et à la même accélération que précédemment.

On obtient ainsi un culot M_3 qui représente les mitochondries pures.

II - LES MITOCHONDRIES PROVENANT DES GLANDES MAMMAIRES

1 - Les Glandes Mammaires

a) Les souris

Les souris utilisées furent les souris de la même lignée que les précédentes c'est à dire C_3H , provenant du même élevage du C.N.R.S. Ces souris étaient des souris femelles vierges, ne présentant aucune affection

tumorale apparente, leur âge était compris entre 6 mois et 1 an .

Il convient de donner quelques précisions concernant cette lignée.

En effet, il existe un élevage deux types de lignées : les lignées de souris à haute incidence de cancer : lignées C_3H / He, et les lignées à faible incidence de cancer : lignées C_3H . En fait, il s'agit de la même lignée pure à l'origine, mais séparée ensuite par le fait que les souris issues de la première lignée ont été nourries systématiquement par une mère porteuse du facteur lacté (virus de BITTNER), les secondes l'ont été par une mère ne portant pas le facteur lacté .

b) Le prélèvement

Les souris ont été tuées par dislocation bulbaire. Les glandes mammaires ont été aussitôt prélevées, et comme pour la tumeur, il en a été fait trois lots, dans la mesure où la quantité prélevée le permettait .

Le premier lot est placé à + 4° C pour usage immédiat

Le second lot est placé à - 20° C pour un usage à court terme
(quelques semaines)

Le troisième lot est placé à - 80° C pour un usage à plus long terme
(quelques mois) .

c) L'homogénéisation

C'est à ce niveau de nos travaux que nous avons rencontré quelques difficultés. En effet, les glandes mammaires saines de souris ont un volume relativement important, mais le tissu adipeux représente la quasi-totalité de ce volume. Il faut donc l'éliminer. On se heurte alors, avec le procédé classique exposé plus haut, à trois types de difficultés.

Le premier problème est celui de l'homogénéisation d'un tissu adipeux. Ce type de tissu est particulièrement résistant, et il est difficile de le broyer dans l'homogénéiseur de POTTER, même après un très fin découpage préalable.

De plus, il semble que ce protocole ne permette pas de retirer les véritables cellules des glandes mammaires qui restent plus ou moins collées aux cellules adipeuses. Enfin, le tissu, une fois broyé paraît reprendre sa consistance première.

Le second problème réside dans le rendement de l'opération.

En effet, s'il y a peu de cellules de glandes mammaires par rapport au volume de tissu prélevé, il y a encore un volume moindre de mitochondries, et à ce niveau de rendement, chaque cellule compte .

Enfin le troisième problème est une conséquence directe de la présence du tissu adipeux, qui au moment des centrifugations à la température de + 4° C, se prend en masse, et modifie sensiblement les conditions de centrifugation.

Donc, en ce qui concerne l'homogénéisation des glandes mammaires de souris, notre méthode citée plus haut pour la tumeur était inutilisable pour des raisons purement techniques et principalement pour son rendement insuffisant.

Une première solution consistant dans l'utilisation d'un homogénéiseur de type BIORTEX tournant à grande vitesse fut alors envisagée. Cette technique ne nous parut pas satisfaisante, car si les tissus étaient effectivement bien broyés, et les cellules éclatées, par contre les mitochondries obtenues étaient très abîmées.

Nous nous sommes alors tourné vers une solution enzymatique , et nous avons essayé d'utiliser la trypsine, couramment employée pour les cultures cellulaires.

Nous n'avons obtenu aucun résultat avec cet enzyme. Nous avons ensuite essayé la pepsine, là encore sans résultats. Nous avons alors recherché dans la littérature les conditions de culture de glandes mammaires. Et c'est en lisant un article de LASFARGUES (60) que nous avons trouvé la solution à notre problème. Considérant que les tissus adipeux entourant les glandes mammaires sont le principal facteur s'opposant à la croissance de l'épithélium en culture de tissu, cet auteur a pensé qu'il devait être possible d'éliminer le tissu adipeux par dissociation enzymatique de l'organe, puis centrifugation. Cet

auteur n'obtint aucun résultat avec la trypsine et diverses protéinases". Par contre, il obtint de bons résultats en utilisant le COLLAGENASE, enzyme protéolytique extrait de *Clostridium histolyticum*, selon la technique décrite par MANDL et collaborateurs (66). L'emploi de cet enzyme à la dose de 0,25 mg/ml à 37° C, pendant un certains temps, permet d'obtenir des tissus pratiquement libres de graisse. Dans ce travail, nous avons utilisé avec des résultats identiques deux lots de COLLAGENASE :

- Le premier lot, nous a été gracieusement confié par Monsieur PREVOT Chef du Service des Anaérobies de l'Institut PASTEUR de Paris,
- Le second lot provient des Etablissements KOCH-LIGHT (Angle-terre).

2) Obtention des mitochondries provenant des glandes mammaires

Chaque expérience a été réalisée à partir des glandes mammaires prélevées sur au moins 20 souris et au maximum 40 souris.

a) La première technique utilisée , sans traitement enzymatique ne nous a pas donné entière satisfaction, bien que certains auteurs l'aient utilisée pour les glandes mammaires de cobayes comme BREW et CAMPBELL (16) et BUTOW et NELSON (19), et d'autres pour les glandes mammaires de lapines comme SMITH et ses collaborateurs (85) (86) .

b) Notre technique a été la suivante : Les glandes mammaires sont découpées le plus finement possible, dans 15 millilitres d'une solution isotonique pour culture de tissus. Cette solution peut-être

-soit le liquide de SIMMS dont la composition est la suivante :

- CHLORURE DE SODIUM..... 8 g
- CHLORURE DE POTASSIUM..... 0,20 g
- CHLORURE DE CALCIUM 0,147 g

- CHLORURE DE MAGNESIUM.....	0,20 g
- PHOSPHATE DISODIQUE 2 H ₂ O...	0,21 g
- GLUCOSE	1 g
- BICARBONATE DE SODIUM	1 g

Pour préparer cette solution, on opère de la manière suivante. les sels de calcium et de magnésium sont pesés et dissous dans 100 ml d'eau distillée. Tous les autres constituants sont pesés et dissous dans environ 800 ml d'eau distillée. Tout en agitant vigoureusement cette solution, on ajoute lentement la solution magnésio-calcique. Le volume est ajusté à un litre, et la solution est stérilisée par filtration.

- soit le liquide de HANKS délivré par l'Institut Pasteur en ampoules, concentré et stérile.

La solution de SIMMS a été utilisée systématiquement dans les premières expériences, car c'était le milieu préconisé par LASFARGUES (60) pour l'étude des glandes mammaires en culture de tissu. Cette solution nous a toujours donné satisfaction.

Par la suite, le remplacement de cette solution par le liquide de HANKS nous a permis d'obtenir des résultats en tous points comparables. La présentation pratique du liquide de HANKS par l'Institut Pasteur, et sa disponibilité dans le laboratoire de Virologie nous ont incité à l'utiliser ensuite régulièrement au lieu et place du liquide de SIMMS.

Nous avons donc utilisé une solution de collagénase dans le liquide isotonique (Simms ou Hanks) à raison de 0,25 mg par ml. Il faut compter 200 ml de la solution de collagénase pour les glandes mammaires provenant de 20 souris, compte tenu des 15 millilitres utilisés pour découper au préalable le tissu mammaire. L'ensemble est placé à l'étuve à 37° C pendant une durée comprise entre 2 heures et 4 heures avec agitation constante par barreau magnétique. Une erreur typographique de notre première publication nous a fait écrire 24 heures au

lieu de 2 à 4 heures (14).

Dès que la dissociation enzymatique est terminée, on place le récipient à $+ 4^{\circ} \text{C}$. Toute la partie lipidique des cellules dissociées par la collagénase se trouve en surface, et se prend rapidement en masse tandis que les parties cellulaires non lipidiques se trouvent sédimentées, ou en suspension dans les deux tiers inférieurs du récipient. Toute cette partie cellulaire, dépourvue de lipides est récupérée au moyen d'une seringue stérile munie d'un trocard de diamètre suffisant pour permettre le passage des fragments tissulaires. La capacité de la seringue est de 50 ml. Le contenu est ensuite rejeté dans un récipient stérile et placé à $+ 4^{\circ} \text{C}$.

Pour récupérer le maximum de cellules en suspension, la totalité du liquide non lipidique est recueillie. La dernière aspiration à la seringue, entraîne inévitablement une petite quantité du gâteau de lipides. La seringue est placée sur un support, trocard dirigé vers le bas, et planté dans une boule de pâte à modeler. Au bout de quelques minutes, le gâteau lipidique aspiré, s'est reformé du côté du piston. Il est alors facile de récupérer la partie non lipidique que l'on joint au liquide préalablement prélevé.

Pour éliminer ensuite la solution de collagénase, la totalité du liquide et des cellules prélevée, est soumise à une première centrifugation à une accélération de 10.000 "g" à la température de $+ 4^{\circ} \text{C}$ dans la centrifugeuse de type L. Le surnageant est éliminé, et le culot est repris par la solution de saccharose 0,25 M isotonique. On soumet à nouveau cette suspension à une seconde puis à une troisième centrifugation, en reprenant à chaque fois le culot par du saccharose neuf.

Le troisième culot obtenu est pratiquement pur de collagénase. C'est ce troisième culot repris par la solution isotonique de saccharose qui est soumis à l'action de l'homogé-

néiseur de POTTER. A partir de cette étape, on retrouve les mêmes opérations homogénéisation et centrifugation, que pour la tumeur mammaire à savoir :

- double centrifugation à 1000 "g" pour sédimenter cellules et débris cellulaires
- triple centrifugation à 10.000 "g" pour sédimenter les mitochondries et les purifier.

Les culots de mitochondries obtenus sont beaucoup moins importants que ceux obtenus avec la tumeur. On comprend aisément les raisons qui nous incitèrent à opérer de cette manière, et avec autant de rigueur.

c) RESULTATS OBTENUS AVEC LES TECHNIQUES UTILISEES

Nous avons souligné au cours de ce qui précède notre constant souci de réaliser d'une part la meilleure rentabilité des opérations pour tenir compte des difficultés rencontrées dans la préparation d'une quantité suffisante de matériel animal et de rendre d'autre part parfaitement reproductible notre technique de traitement enzymatique.

Un facteur particulièrement important est apparu au cours de ces diverses opérations : le facteur "stérilité". Il faut absolument, compte tenu de la richesse en saccharose du milieu utilisé, travailler dans des conditions de stérilisé convenables et suffisantes si on veut éviter la pollution rapide de tout le matériel.

Le nombre de culots de mitochondries obtenu a été calculé par rapport au poids humide, soit de tumeur, soit de glandes mammaires ; on retrouvera ces valeurs dans le tableau où figure également le taux de protéines mitochondriales (voir le tableau n° 3).

Les culots de mitochondries sont aussitôt utilisés, pour l'étude chimique, électrophorétique, immunologique, ou pour l'étude du contrôle de la pureté en microscopie électronique.

D) CONTROLE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Toujours pour économiser le matériel, nous avons été amené à faire le contrôle de nos culots de centrifugation par la technique de microscopie électronique, selon deux méthodes :

- l'une rapide qui demande très peu de matériel : il s'agit de la technique de coloration négative à l'acide phosphotungstique que l'on trouve dans les publications sous le sigle P.T.A.
- l'autre, plus longue, qui demande un peu plus de matériel et qui est la technique d'inclusion et de coupe .

Nous avons préféré utiliser cette technique plutôt que celle de la détermination de la déshydrogénase succinique, car elle nous semble plus adaptée à notre travail ; on sait en effet que les mitochondries renferment 80 % de la déshydrogénase succinique cellulaire, et cet enzyme est considéré comme caractéristique de cette fraction cellulaire. De plus notre technique de microscopie électronique, a l'avantage de nous permettre de comparer la morphologie des mitochondries isolées de tumeur mammaire et de glandes mammaires saines de souris de même lignée.

I - Technique de microscopie électronique en coloration négative -

1 - Technique utilisée (76)

- Une anse de platine du culot de mitochondries est mise en suspension dans 1 ml de solution d'acide phosphotungstique à 1% dont la préparation est la suivante :

-ACETATE D'AMMONIUM.....	1,00 g
-ACIDE PHOSPHOTUNGSTIQUE	1,00 g
-SACCHAROSE	0,20 g

Ces composants sont dissous dans environ 80 ml d'eau permutée.

-Le pH de la solution est ramené à 7,4 au moyen d'une solution de soude N. Le volume est complété ensuite à 100 ml avec de l'eau permutée.

-La suspension réalisée est soigneusement agitée de manière à avoir une suspension homogène.

-quelques gouttes de cette suspension sont placées sur une plaque de cire dentaire et sur leur surface, une grille recouverte d'un film de PARLODION à 0,5 % et de Carbone est déposée. Le contact est maintenu pendant 10 minutes .

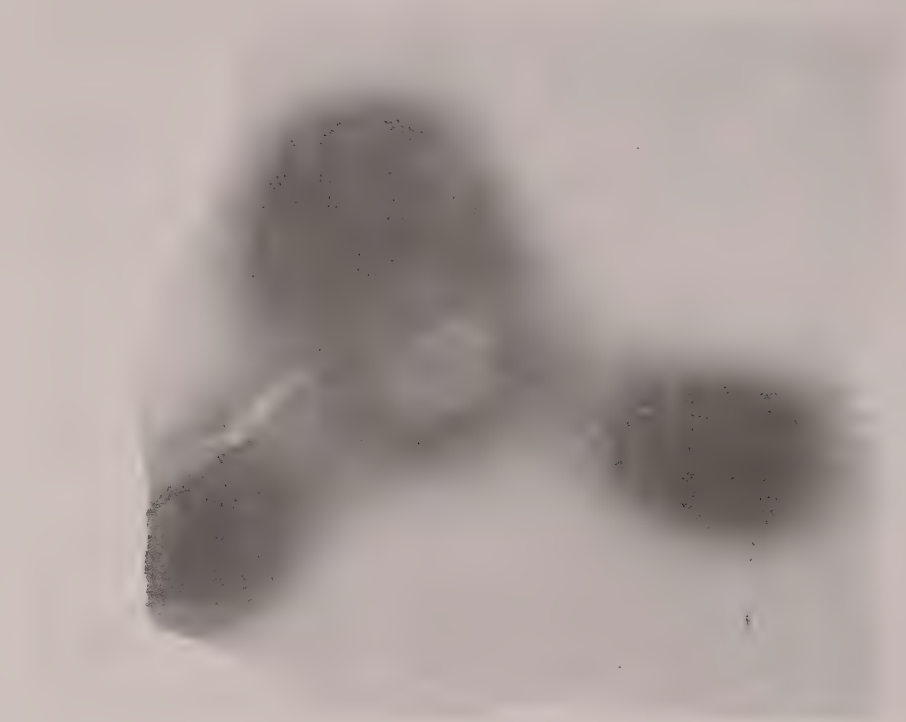
-Au bout de ce temps, les grilles sont séchées puis examinées au microscope SIEMENS type ELMISKOPE .

2 - Résultats obtenus -

Pour cette première technique, et comme le montrent les photographies n° 1, n° 2, n° 3, nous pouvons conclure :

- a) que notre culot est homogène et ne renferme que des mitochondries, que ce soit dans le cas de la tumeur ou dans celui du tissu mammaire sain.
- b) qu'il n'y a aucune différence morphologique comme nous l'avons déjà indiqué précédemment (14)
- c) la photographie n°2, au grossissement X 120.000 permet d'observer la double membrane.
- d) Etant donné l'épaisseur de la mitochondrie, il n'est pas possible d'observer les crêtes. Cependant, on peut noter sur les photographies, et surtout sur la n° 2 la présence de granulations qui peuvent faire penser soit au début des crêtes, soit aux granules sphériques qui sont situées sur les membranes.

Grossissement : X 60.000 6 cm représentent 1μ



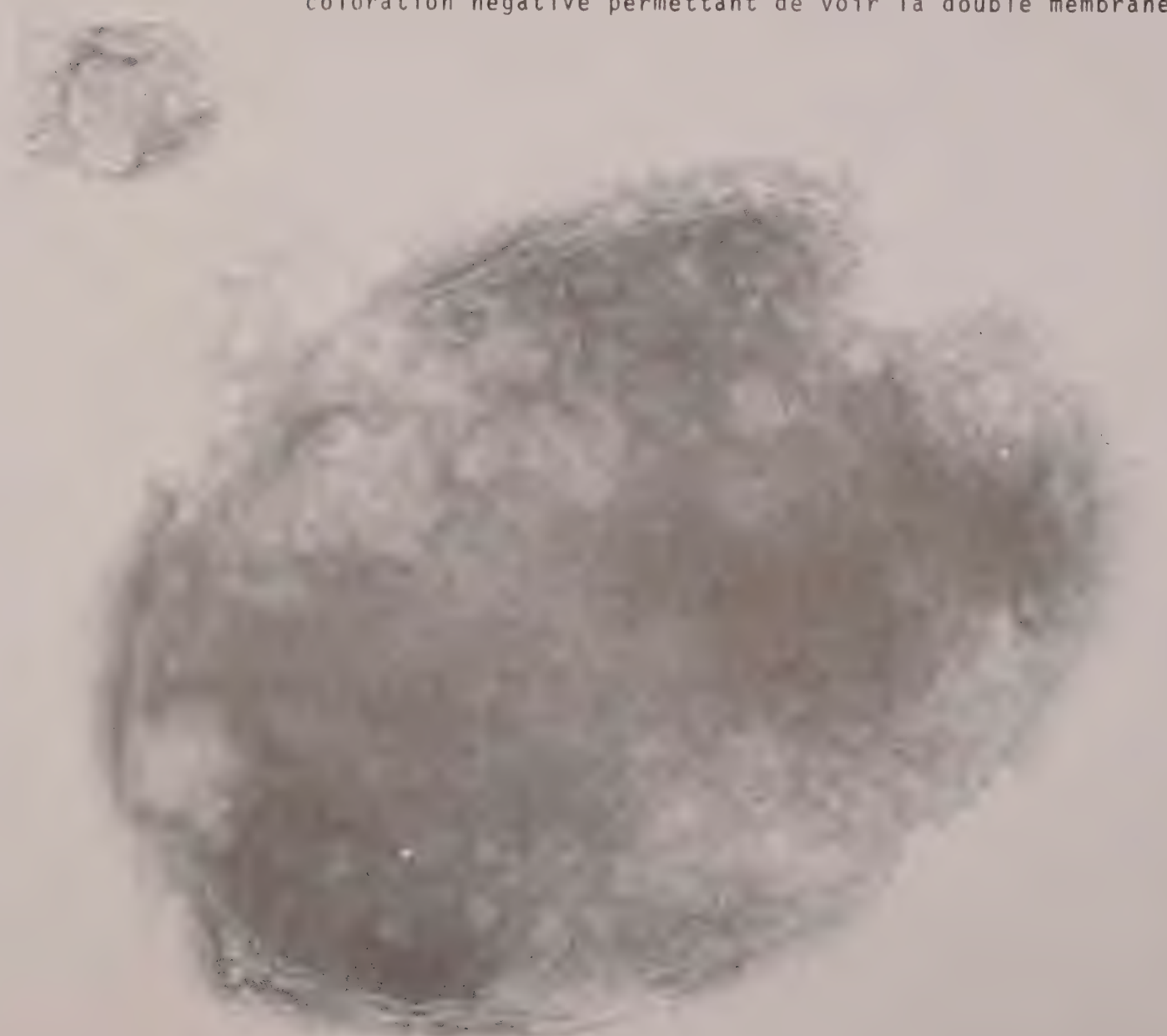
PHOTOGRAPHIE N° 1

Mitochondries de la tumeur mammaire au microscope électronique
en coloration négative à l'acide phosphotungstique à 1 %.

Grossissement x X 120.000 12 cm représentent 1 μ

PHOTOGRAPHIE N° 2

Mitochondrie de la tumeur mammaire au microscope électronique
coloration négative permettant de voir la double membrane.



Grossissement X 60.000

6 cm correspondent à 1 μ



PHOTOGRAPHIE n° 3

Mitochondrie de glande mammaire saine de souris, au microscope électronique, après coloration négative.

Cette technique est une technique rapide, facilement utilisable en routine, elle permet un contrôle efficace des préparations. Néanmoins, pour apporter plus de précisions, nous avons effectué des inclusions et des coupes de manière à confirmer les premiers résultats obtenus.

II - Techniques de microscopie électronique après inclusion et coupe

1 - Technique utilisée (76)

Une partie aliquote d'un culot de mitochondries est traitée par 2 ml d'une solution d'acide osmique à 2% préparée extemporanément dans le tampon saccharose qui a servi à l'isolement des mitochondries.

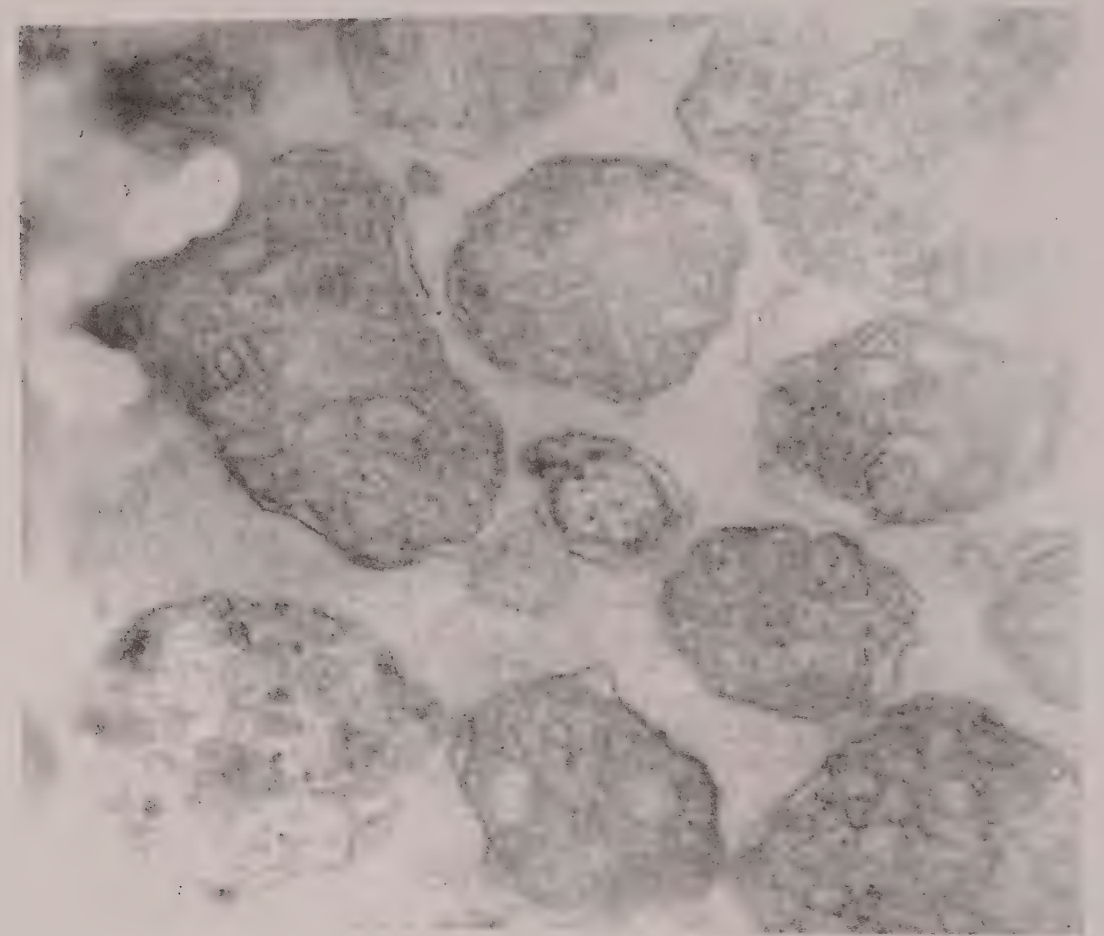
On laisse la fixation pendant une heure à la température de + 4°. Puis on centrifuge, on rejette le surnageant qui renferme l'acide osmique, on lave le culot une fois au moyen du tampon saccharose et on le laisse en contact pendant 24 h à + 4° après une nouvelle addition du tampon saccharose de manière à obtenir une imprégnation homogène.

Après 24 h, on déshydrate le culot au moyen de bains d'acétone successifs :

- Bains d'acétone à 50 % 2 fois trois minutes
- Bains d'acétone à 70 % 2 fois trois minutes
- Bains d'acétone à 90 % 2 fois trois minutes
- Bains d'acétone à 100 % 2 fois quinze minutes
- Bains d'acétone à 100 % 1 fois quinze minutes

On pratique ensuite les inclusions du culot en mélange EPON-ARALDITE selon la technique de MOLLENHAUER (68). Les coupes ont ensuite été effectuées à l'aide d'un ultratome L.K.B. à couteaux de verre, puis déposées sur les grilles

Grossissement X 90.000 : 9 cm représentent 1 μ



PHOTOGRAPHIE n° 4

Mitochondries de la tumeur mammaire après inclusion et coupe

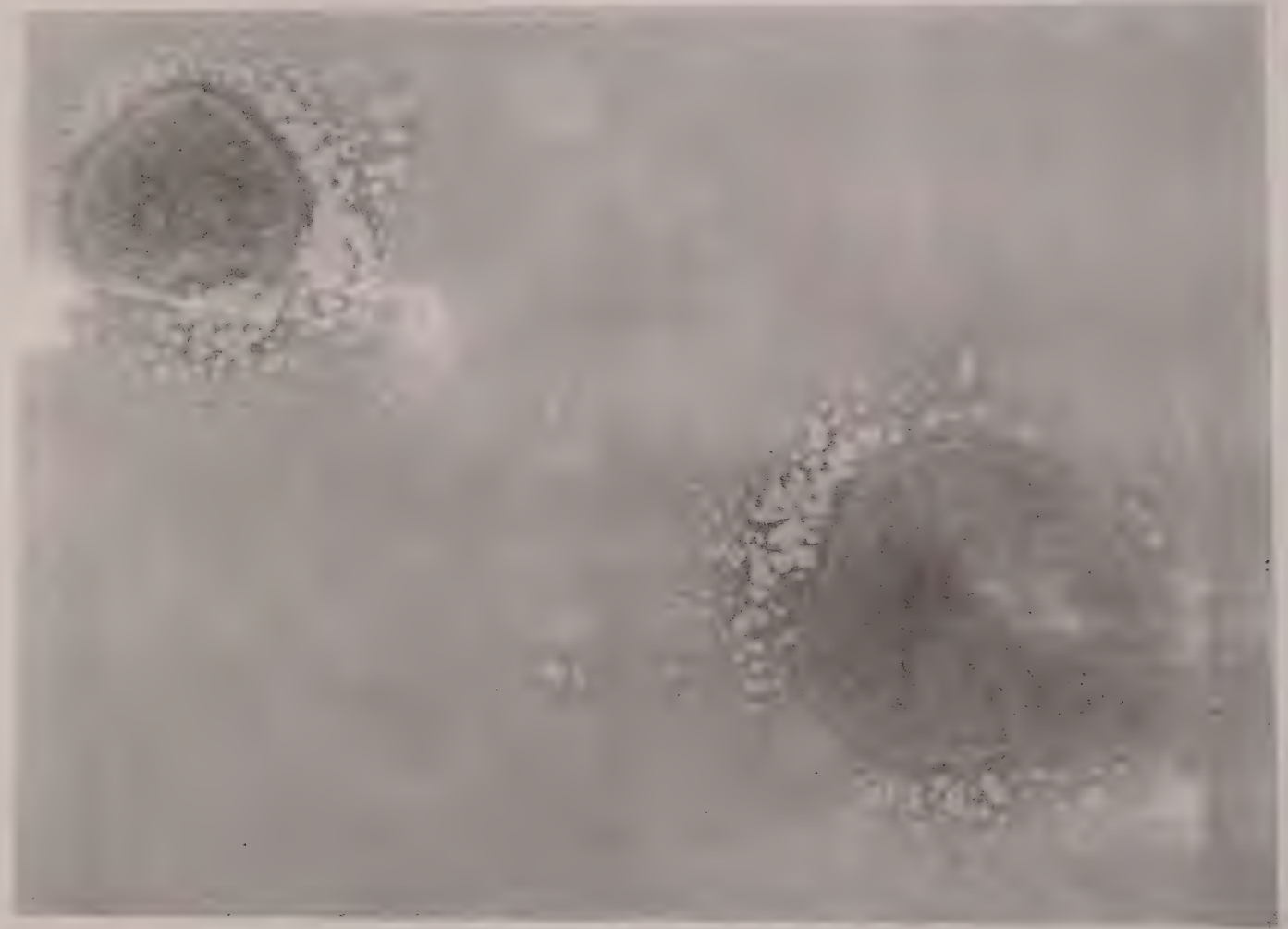
Grossissement X 90.000 : 9 cm représentent 1 μ



PHOTOGRAPHIE n° 5

Mitochondries des glandes mammaires saines après inclusion et coupe

Grossissement x 60.000 6 cm correspondent à 1 μ



PHOTOGRAPHIE n° 6

Mitochondries de glandes mammaires, en coloration négative.
L'acide phosphotungstique a pénétré à l'intérieur par suite
de la rupture d'une partie de la membrane.

préalablement revêtues d'un film de PARLODION)à 0,5 % et de CARBONE.

Ces coupes sont ensuite colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de Plomb selon la technique de REYNOLDS (82) et examinées au microscope SIEMENS type ELMISKOPE .

2 - Résultats obtenus

La technique ainsi utilisée nous a permis de mieux contrôler la pureté de nos culots. Nous avons retrouvé sur les photos la présence de peroxysomes que l'on isole en même temps que les mitochondries et de rares particules faisant penser à des ribosomes.

L'étude cytologique des coupes n'a pas montré des différences fondamentales entre les deux types de mitochondries. Par contre le contenu mitochondrial paraît particulièrement abondant dans ces deux types .

E) CONCLUSIONS RELATIVES A LA PREMIERE PARTIE

Notre étude du tissu mammaire normal, et du tissu tumoral correspondant nous a permis de rendre compte d'une technique d'isolement des mitochondries de ces tissus qui donne toute satisfaction.

Une récente étude morphométrique de l'organisation sub-cellulaire des tissus mammaires normaux en état de lactation, et des tumeurs mammaires correspondantes a été faite récemment par HOLLMAN et ses collaborateurs. (46) .

Cette étude qui porte sur des coupes de tissu, et non sur des organites isolés apporte des précisions intéressantes .

Elle montre que les cellules lactantes normales sont caractérisées par un grand développement des organites cytoplasmiques. C'est ainsi que les mitochondries occupent un volume représentant 11,2 % du volume cytoplasmique , gouttelettes lipidiques exclues. A l'inverse, les cellules provenant des divers cancers mammaires examinés, que les tumeurs soient sécrétrices ou non, ont des organites cellulaires moins développés que les cellules lactantes normales. Elle prouve enfin qu'il n'existe pas de relation entre le nombre de particules virales dans une section donné et le degré de développement des organites cellulaires.

Il semblerait donc d'après HOLLMAN que les cellules tumorales, même les plus différenciées, le soient moins que les cellules du tissu mammaire normal en état de lactation.

L'étude cytologique faite par HOLLMAN, quoique très intéressante pour nous, laisse de côté le contenu mitochondrial que nous nous proposons d'examiner dans les deux types de tissus non sécréteurs :

- Tumeur greffée non sécrétrice,
- Glandes mammaires de souris vierges.

Ce travail fait l'objet de la deuxième partie de notre thèse .

DEUXIEME PARTIE

ETUDE COMPARATIVE DU CONTENU PROTEIQUE ET LIPIDIQUE
DES MITOCHONDRIES ISOLEES

C H A P I T R E I

ETUDE CHIMIQUE DU CONTENU MITOCHONDRIAL

Extraction, dosage et étude électrophorétique des protéines des mitochondries isolées de la tumeur mammaire et des glandes mammaires.

A - I N T R O D U C T I O N

D'après les études relatives au rôle des mitochondries au sein de la cellule que nous avons rappelées dans ce qui précède, nous savons que le contenu de ces mitochondries est essentiellement constitué par des enzymes qui servent essentiellement à la formation de l'A.T.P. De très nombreuses études enzymatiques ont été faites et publiées sur les mitochondries, et on peut pratiquement retrouver les principales dans les symposiums, tables rondes, et ouvrages parus en 1963 (20) en 1964 (62), en 1965 (38) et en 1968 (28) .

Les tissus qui ont servi à ces différentes études sont : le foie, le cerveau, le coeur, le muscle, la thyroïde. De ces études il ressort que la principale activité est celle de la déshydrogénase succinique qui sert de pivot à la respiration des mitochondries. C'est la raison pour laquelle la détermination de cette activité reste un des témoins les plus fidèles du bon état des mitochondries après leur isolement.

Cependant dans notre travail, nous avons volontairement laissé de côté l'étude enzymatique comparative, car les recherches faites par AISENBERG (1) comparativement avec onze tissus sains, et leurs homologues tumoraux, n'ont pas montré de différences fondamentales. Il en a été de même pour les travaux de GRAFFI (35) qui ont abouti à la même conclusion.

Nous nous sommes d'abord attaché à étudier le contenu protéique global des mitochondries en effectuant un dosage des protéines. Nous avons effectué ensuite une séparation de ce contenu protéique au moyen de la technique d'électrophorèse sur acétate de cellulose.

Avant d'envisager les techniques utilisées, qui ont été les mêmes pour les deux types de mitochondries, nous avons été amené à étudier le mode de rupture des membranes et de solubilisation des protéines mitochondriales .

B - METHODE DE RUPTURE DES MEMBRANES ET DE SOLUBILISATION DES PROTEINES

I - Les procédés utilisables :

Il existe de nombreux procédés de rupture des membranes des mitochondries. Il est en effet indispensable de les rompre pour en étudier le contenu .

PULLMANN et PENEFSKY (80) décrivent une méthode de rupture mécanique dans un appareil spécial décrit par NOSSAL .

KIELLEY (53) utilise les vibrations ultra-soniques comme moyen de rupture .

WADKINS et LEHNINGER donnent leur préférence à la digitonine(92)

HAREL, JACOB et MOULE (40) utilisent une rupture mécanique en combinant les effets du gel et du dégel brusque aux variations de pression osmotique du milieu.

Les publications les plus nombreuses montrent l'utilisation d'agents tensio-actifs pour rompre les membranes et surtout pour solubiliser les protéines mitochondriales.

BURKHART et KROFT (18) utilisent trois produits tension-actifs sur les mitochondries de coeur de boeuf, à savoir : le Désoxycholate de Sodium, le cholate de Sodium et le Dodécyl sulfate .

MORTON (70) associe l'utilisation des vibrations sonores avec l'action du Désoxycholate de Sodium .

CONGIU (24) et UGAZIO (90) utilisent comme agent tensio-actif le TRITON X 100 en solution dans un tampon Véronal - Véronal sodique de pH = 8,6 .

Enfin, d'AMELIO, MUTOLO et BARBARINO (2) utilisent dans leur étude trois types de détergents en plus du Désoxycholate de Sodium, à savoir :

- le DUPONOL P
- le LUBROL W
- le perfluoro octanoate de Sodium

Tous ces détergents synthétiques sont certainement des agents dénaturants pour les protéines comme l'ont montré AIGON (4) et FOX et FOSTER (31), qu'ils soient de nature anionique ou cationique, Ils sont très probablement les plus actifs car ils agissent sous une très faible concentration. Dans le domaine de la Biochimie, il apparait que les détergents peuvent conduire de manière variable à la précipitation, à la désagrégation, et même à la stabilisation des protéines.

C'est dire que l'interaction protéine-détergent peut se manifester de façon très diverse. Il existe notamment une combinaison de ces deux produits, dont l'existence a été prouvée par LUNGREEN (63) au moyen de la technique électrophorétique .

Grâce à leur faculté de pouvoir former des complexes, et grâce à leur pouvoir mouillant, les détergents peuvent d'une part rompre les membranes des mitochondries, et d'autre part, solubiliser les protéines insolubles dans l'eau et les solution salines, telles les protéines des mitochondries .

C'est la raison pour laquelle nous avons fait appel dans cette étude à l'utilisation des détergents suivants :

- Le Désoxycholate de Sodium (B.D.H. Laboratory)
- le DUPONOL P *
- le LUBROL W *
- le TRITON X 100 *
- le Dodécyl Sulfate *

Ce dernier nous intéressera plus particulièrement car outre les propriétés générales communes aux autres, il est maintenant couramment utilisé pour l'extraction de l'acide désoxyribonucléique. C'est pourquoi, nous lui avons donné la préférence dans certaines expériences .

* Nous remercions la Maison TOUZART & MATIGNON qui nous a gracieusement fourni les échantillons de ces produits.

II - Le Procédé utilisé

Le procédé que nous avons utilisé a été le suivant. Un culot de mitochondries, provenant soit de la tumeur, soit des glandes mammaires saines est repris par la solution de détergent à raison de 1 ml par culot. La solution de détergent est une simple dissolution de celui-ci dans le tampon Véronal sodique de pH = 8,6, dont la composition est la suivante :

VERONAL	1,66 g
VERONAL SODIQUE	12,76 g
EAU DISTILLÉE	Q.S.P. 1.000 ml

Cette solution est une solution mère. Cette solution est ensuite diluée à 625 ml pour mille de manière à obtenir une force ionique de 0,05. Cette solution ainsi diluée servira à la préparation des solutions de détergents et sera utilisée pour les expériences électrophorétiques.

Les concentrations suivantes ont été adoptées :

- | | | |
|--|---|---|
| - 3% de DUPONOL dans le tampon Véronal-Véronal sodique | | |
| - 3% de LUBROL W | " | " |
| - 5% de TRITON X 100 | " | " |
| - 0,05 M de DODECYL SULFATE | " | " |
| - 1,5 % de DESOXYCHOLATE | " | " |

Chaque culot de mitochondries repris par un détergent est placé sur un agitateur de KAIN pendant 24 heures à la température du laboratoire. Puis après 24 heures, le mélange est soumis à centrifugation dans une centrifugeuse de type SPINCO type L à l'accélération de 20.000 "g" pendant 20 minutes ; le surnageant est séparé et soumis aux analyses chimiques et électrophorétiques. Le culot est conservé pour déterminer son taux de protides .

C) DOSAGE DES PROTEINES MITOCHONDRIALES

Nous avons déterminé la teneur en protéines du surnageant (S) et du culot (C), par la réaction du Biuret, avec le réactif de GORNALL dont la composition est la suivante :

Sulfate de Cuivre 5 H ₂ O	1,50 g
Tartrate de Sodium et de Potassium	6,00 g
Soude à 10%	300 ml
Iodure de Potassium	1,00 g
Eau distillée Q.S.P..	1.000 ml

L'étalonnage de cette méthode a été réalisé à l'aide de dilutions d'albumine bovine, de façon à obtenir des taux de 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, qui correspondent à des solutions d'albumine bovine échelonnées entre 4 g/litre et 8 g/litre. Toutes les dilutions sont effectuées dans du sérum physiologique .

I - Mode opératoire pour le surnageant

Afin d'obtenir une meilleure précision, nous avons préféré travailler sur des solutions assez concentrées en protéines; c'est pourquoi nous avons utilisé une prise d'essai de 0,50 ml. Parallèlement, l'étalonnage a été effectué avec 0,50 ml des différentes dilutions d'albumine bovine.

Le mode opératoire a été le suivant :

1) Courbe d'étalonnage

Solution à 4 mg/ml	0,5	-	-	-	-	-	-
Solution à 5 mg/ml	-	0,5	-	-	-	-	-
Solution à 6 mg/ml	-	-	0,5	-	-	-	-
Solution à 7 mg/ml	-	-	-	0,5	-	-	-
Solution à 8 mg/ml	-	-	-	-	0,5	-	-
Eau physiologique	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1
Bien homogénéiser, puis ajouter							
Réactif de GORNALL	4	4	4	4	4	4	4

Il se produit une coloration violette qui se stabilise après 30 minutes à la température du laboratoire. On apprécie la coloration en mesurant la densité optique à 520 m μ à l'aide d'un Spectrophotomètre, le zéro de l'appareil étant réglé sur le tube témoin (Blanc des réactifs).

2) Dosage des protéines du surnageant

Le protocole du dosage des protéines du surnageant est indiqué ci-après, étant bien précisé que le protocole de lecture est le même que celui de l'étalonnage, et que l'on doit se reporter à la courbe d'étalonnage précédemment établie .

Surnageant	-	0,5
Eau physiologique	1	0,5
Bien agiter, puis ajouter :		
Réactif de GORNALL	4	4

II - Mode opératoire pour le culot

Le culot après centrifugation est repris par 1 ml de Soude Normale, et placé pendant 5 minutes au Bain-Marie bouillant.

Après refroidissement, on ajoute 4 ml de réactif de GORNALL et on opère comme précédemment, avec le même étalonnage.

III - Les Résultats :

Les résultats des six expériences principales sont reproduits dans les tableaux n° 1, n° 2 et n° 3 pour la tumeur, et dans les tableaux n° 4 , n° 5, n° 6 pour les glandes mammaires saines.

Les éléments les plus importants que l'on peut en retirer sont les suivants :

- 1) Le meilleur taux d'extraction des protéines a été réalisé avec le Dodécyl Sulfate, et cela dans les deux cas.
- 2) Il convient de remarquer la constance du taux de mg de protéines par gramme de tumeur : soit 7,2 mg de moyenne ainsi que celle du taux de mg de protéines par gramme de glandes mammaires : soit 1,13 mg de moyenne.

DETERGENT	S1	C1	S2	C2	S3	C3	S4	C4	S5	C5	S6	C6
D.O.C. mg/ml	6,5	2,7	4,6	2,4	3,5	2	4,5	2,2	6,2	2,6	7	3
%d'extraction	70	30	67	33	64	36	67	33	70	30	70	30
D.D.S. mg/ml	6,5	2	6,5	1,5	4,6	1,5	5,5	1,2	6,1	2,3	6,8	2,2
%d'extraction	77	23	81	19	76	24	82	18	70	30	75	25
D.U.P. mg/ml	5,5	3,5	6,5	1,5	4,6	2	5	1,7	5	3,2	6	3,5
%d'extraction	61	39	81	19	70	30	74	26	61	39	63	27
L.U.B. mg/ml	4,5	4	3,1	3,5	3,5	2,5	4,6	2	4,8	4	5,5	4
%d'extraction	53	47	47	53	58	42	69	31	54	46	57	43
T.T.X. mg/ml	5	3,5	3,9	2,8	3,5	2,4	4	2,5	5	3,6	5	4,2
%d'extraction	59	41	58	42	59	41	61	39	58	42	54	46

TABLEAU n° 1

Taux en mg par ml des protéines de mitochondries de la tumeur mammaire, et pourcentage d'extraction des protéines avec les détergents utilisés.

D.O.C. = Désoxycholate de sodium D.D.S. = Dodécyl sulfate

D.U.P. = Durodol L.U.B. = Lubrol W

T.T.X. = Triton X 100

	D.O.C.	D.D.S.	D.U.P.	L.U.B.	T.T.X.
Pourcentage moyen d'extraction	68%	77%	69%	56%	58%

TABLEAU N° 2 : Pourcentage moyen d'extraction des protéines de la tumeur au moyen des différents détergents utilisés.

Poids humide de tumeur	6,25 g	7 g	6,5 g	7,5 g	8 g	10 g
Total protéines mitochondries	43,7 mg	51 mg	48,4 mg	54,9 mg	55 mg	70,2 mg
Taux de protéines par gr.de tumeur	7 mg	7,3 mg	7,6 mg	7,3 mg	7mg	7 mg
Nombre de culots obtenus	5	7	8	9	7	8
Taux de protéines par culot	8,7 mg	7,3 mg	6 mg	6,1 mg	7,8 mg	8,8 mg

TABLEAU N° 3 : Tableau récapitulatif : taux de protéines mitochondriales par gramme de tumeur et par culot utilisé.

Ce fait explique les difficultés que nous avons rencontrées pour obtenir un rendement suffisant avec le tissu sain.

3) Par rapport au poids humide, le tissu sain renferme 6,4 fois moins de protéines mitochondriales que le tissu tumoral, par suite essentiellement, de la présence en grande quantité du tissu adipeux au niveau des glandes mammaires.

4) Toujours en fonction des résultats, et compte tenu de ce que chaque culot, récupéré est repris par 1 ml de la solution de détergent, il peut être noté que les concentrations de protéines dans ce travail ont toujours été supérieures à 5 mg/ml. Ceci est important pour les études immunologiques qui suivent .

5) Enfin, il peut être aussi noté que les pourcentages d'extraction sont sensiblement les mêmes pour chaque détergent, avec d'une part le tissu sain, et d'autre part, avec le tissu tumoral.

IV - Discussion des résultats :

En fait, ce ne sont pas tant les résultats obtenus qui sont plus intéressants que les raisons de l'utilisation des détergents. La réalisation d'une solubilisation poussée impose, à notre avis, l'emploi du dodécyl sulfate, substance maintenant couramment utilisée dans l'extraction des acides désoxyribonucléiques. Le plus fort pourcentage d'extraction obtenu pourrait ainsi être expliqué, en admettant toutefois que les mitochondries renferment une quantité d'A.D.N. suffisante pour justifier la différence constatée. Cette hypothèse nous semble d'ailleurs plausible.

DETERGENT	S1	C1	S2	C2	S3	C3	S4	C4	S5	C5	S6	C6
D.O.C. mg/ml	6,1	2,4	5	2,1	3,8	1,6	3,6	2	4,3	1,7	4,8	2,2
%d'extraction	72	28	70	30	70	30	65	35	71	29	66	34
D.D.S. mg/ml	6,3	2,1	6	1,4	4	1,2	4,1	1,9	4,4	1,5	4,9	2
%d'extraction	75	25	81	19	77	23	63	32	75	25	71	29
D.U.P. mg/ml	5,7	3	4,5	2	3,8	1,4	3,3	2,2	3,9	2,3	4,8	2,1
%d'extraction	65	35	69	31	72	28	60	40	63	37	70	30
L.U.B. mg/ml	4,2	3,2	4	3,4	2,5	2,5	2,9	3,1	3,4	2,5	3,5	3,5
%d'extraction	57	43	55	45	50	50	48	52	58	42	50	50
T.T.X. mg/ml	5	3	3,8	3,2	2,9	1,9	3	2,7	3,2	2,8	4	3,2

TABLEAU n° 4

Taux en mg par ml des protéines de mitochondries des glandes mammaires, et pourcentage d'extraction des protéines avec les détergents utilisés.

	D.O.C.	D.D.S.	D.U.P.	L.U.L.B.	T.T.X.
Pourcentage moyen d'extraction	69%	74,5%	63%	53%	56,5%

TABLEAU N° 5 : Pourcentage moyen d'extraction des protéines des glandes mammaires au moyen des différents détergents utilisés.

Poids humide de glandes mammaires	39g	30g	21g	34g	42g	32g
Total protéines mitochondries	41mg	35,4 mg	25,7 mg	38 mg	48 mg	35 mg
Taux de protéines par gr.de glande mammaire	1,05	1,16	1,22	1,12	1,14	1,10
Nombre de culots obtenus	5	5	5	7	7	5
Taux de protéines par culot	8,2	7,1	5,1	5,4	6,9	7

TABLEAU N° 6 : Tableau récapitulatif : taux de protéines mitochondriales par gramme de tumeur et par culot utilisé

D - ETUDE ELECTROPHORETIQUE COMPAREE DES PROTEINES DES MITOCHONDRIES NORMALES ET TUMORALES .

Les quelques études électrophorétiques qui ont été faites, ont porté sur les protéines de mitochondries de foie de rat. La technique utilisée par d'AMELIO et ses collaborateurs (2) est une technique d'électrophorèse sur support gélosé; celle qu'emploie UGAZIO (90) est une technique sur support papier. Enfin KALLEE (50) fait appel à la technique d'électrophorèse libre.

Dans cette étude, nous avons utilisé l'électrophorèse sur acétate de cellulose, selon la technique de KROHN (56) .

I - Protocole opératoire

1 - Matériel

Nous nous sommes servi des bandes Cellogel, fabriquées par CHEMTRON, et distribuées par SEBIA. La migration a eu lieu dans une cuve fournie par la même maison, avec un redresseur de courant APELAB type S T ₃ B permettant de fournir un voltage compris entre 0 et 400 volts.

La cuve à saturation est de dimensions réduites, ce qui présente l'avantage d'arriver à saturation rapidement et d'éviter les trainées entre les fractions, également dues à une évaporation excessive du tampon présent sur la bande en cours de migration.

2 - Méthode

Les bandes de Cellogel sont présentées sous emballage étanche renfermant de l'alcool méthylique. Les bandes non utilisées doivent être conservées dans de l'alcool méthylique dilué au tiers. Le nombre de bandes nécessaires aux expériences (cinq au maximum pour la cuve utilisée) sont placées pendant au moins 15 minutes et au plus 1 heure dans un récipient contenant la solution tampon décrite plus haut, diluée à 625 pour 1.000 et ayant une force ionique de 0,05 . Cette opération a pour but d'imprégner les bandes de la solution tampon. Le tampon ayant servi à l'imprégnation des bandes doit être rejeté. Après 15 à 20 minutes de trempage, les bandes sont sorties et on les exprime doucement entre deux épaisseurs de papier filtre de manière à éliminer l'excès de tampon à la surface de la bande.

Le dépôt de l'échantillon se fait à peu près au tiers de la bande du côté cathodique, les bandes étant placées sur le support, dans la cuve renfermant la solution tampon . Les échantillons sont disposés à l'aide d'une lamelle de microscope dont la largeur est légèrement inférieure à celle de la bande. Pour que le dépôt soit le plus régulier possible, il y a intérêt à placer la lamelle bien en contact avec le côté mat de la bande, et à la laisser parfaitement verticale jusqu'à ce que l'absorption soit complète.

Lorsque les dépôts sont effectués, la cuve est fermée, et la migration est mise en route pendant deux heures sous 140 volts, en vérifiant que l'intensité ne dépasse pas 2 mA par bande. Si elle est supérieure à cette valeur, il faut changer le tampon de la cuve.

Après deux heures de migration, le courant est coupé, les bandes sont sorties de la cuve, et plongées dans le bain de colorant dont la composition est la suivante :

Amido-Schwartz.....	5 g
Alcool Méthylique	450 ml
Eau distillée	450 ml
Acide Acétique	100 ml

Après 20 à 30 minutes de contact, le bain de colorant est rejeté, et les bandes sont placées dans une série de bains de décolorants dont la composition est la suivante :

Alcool Méthylique	475 ml
Eau Distillée	475 ml
Acide Acétique	50 ml

Lorsque le fond est suffisamment décoloré, on peut passer au dernier temps qui consiste à rendre les bandes transparentes. Pour cela celles-ci sont trempées dans le bain suivant pendant 15 minutes :

Eau Distillée	500 ml
Alcool Méthylique	400 ml
Acide Acétique	50 ml
Diacétone Alcool	100 ml

Les bandes sont ensuite essorées entre deux épaisseurs de papier filtre, puis placées entre deux plaques de verre parfaitement propres et mises à l'étuve jusqu'à ce qu'elles soient transparentes.

Il existe une technique plus récente pour rendre les bandes transparentes ; cette technique utilise une solution de glycérol, elle est plus délicate mais plus rapide d'exécution .

II - Résultats obtenus

Les résultats que nous avons obtenus sont représentés sur les schémas n° 5, n° 6, n° 7, n° 8 .

Il convient de remarquer en premier lieu, la présence sur toutes les bandes d'électrophorèse d'un arc protéique migrant du côté cathodique. D'autre part, il subsiste sur toutes les bandes, au niveau du point de départ, une certaine quantité de protéines qui ne migrent pas. Il s'agit vraisemblablement de lipoprotéines. Pour essayer de les faire migrer ,

nous avons essayé de déposer l'échantillon sous tension selon la technique recommandée par les fournisseurs, pour les électrophorèses de sérum humain. Cette technique n'a pas donné de résultats satisfaisants.

Lorsque les extractions sont faites avec le Lubrol W et le Triton X 100, les électrophorèses ne présentent qu'une seule bande large du côté anodique, et une seule bande fine du côté cathodique, avec le tissu sain et avec le tissu tumoral. Par contre, les électrophorèses obtenues avec le résultat du traitement par le Duponol, le Désoxynolate de Sodium et le Dodécyl Sulfate sont plus intéressantes. Deux types d'électrophorèse se ressemblent beaucoup. Il s'agit de celles obtenues avec le traitement au Duponol, et le traitement au Dodécyl Sulfate. On obtient en effet un tracé électrophorétique voisin, mais par contre très différent de celui obtenu après traitement par le Désoxynolate de Sodium.

Nous n'avons pas noté de différences essentielles entre les protéines issues des mitochondries du tissu sain, et celles issues des mitochondries de tissu tumoral, à une exception près, avec le Dodécyl Sulfate, comme nous l'avons publié précédemment (14).

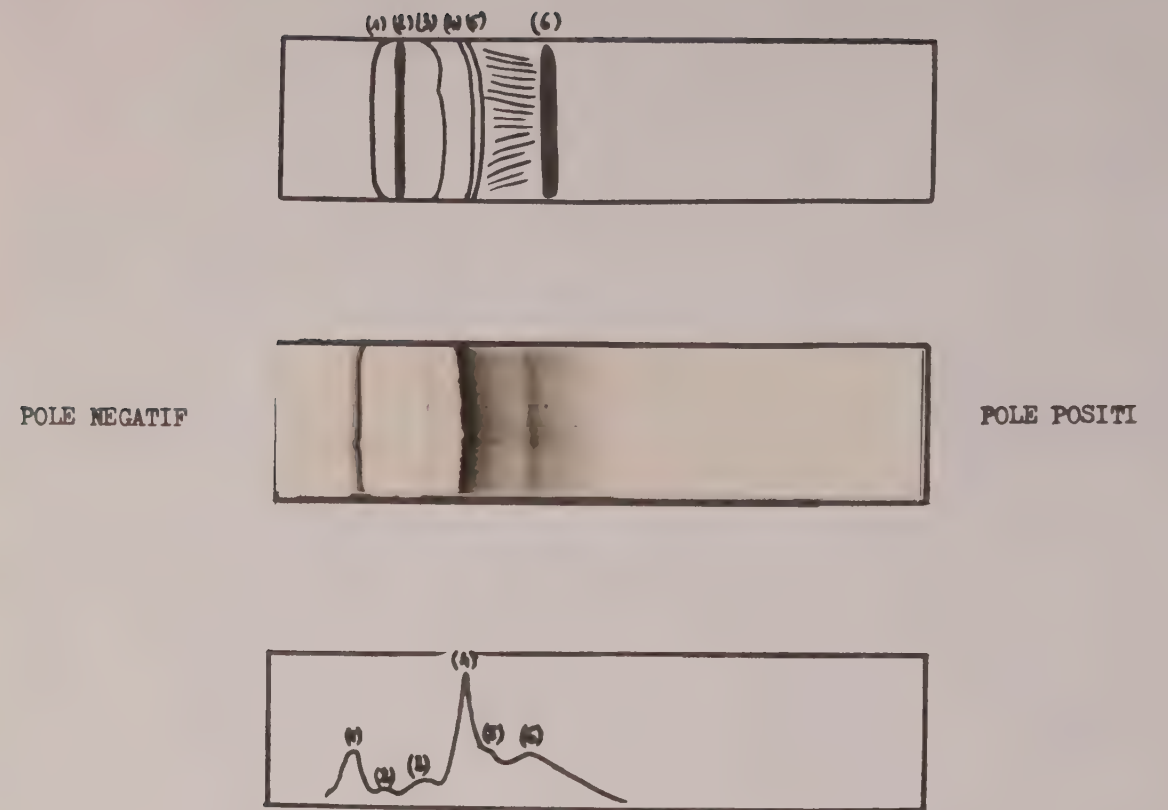
Si l'on fait l'analyse comparative des électrophorèses obtenues après traitement par le Dodécyl Sulfate, on peut noter :

1 - Sur les deux électrophorèses :

- la bande cathodique n° 1
- la bande de dépôt (protéines ne migrant pas) n° 2
- la bande n° 3 plus ou moins intense selon qu'il s'agit de tissu sain ou de tissu tumoral.
- la bande n° 5 pour le tissu sain et n° 6 pour la tumeur.

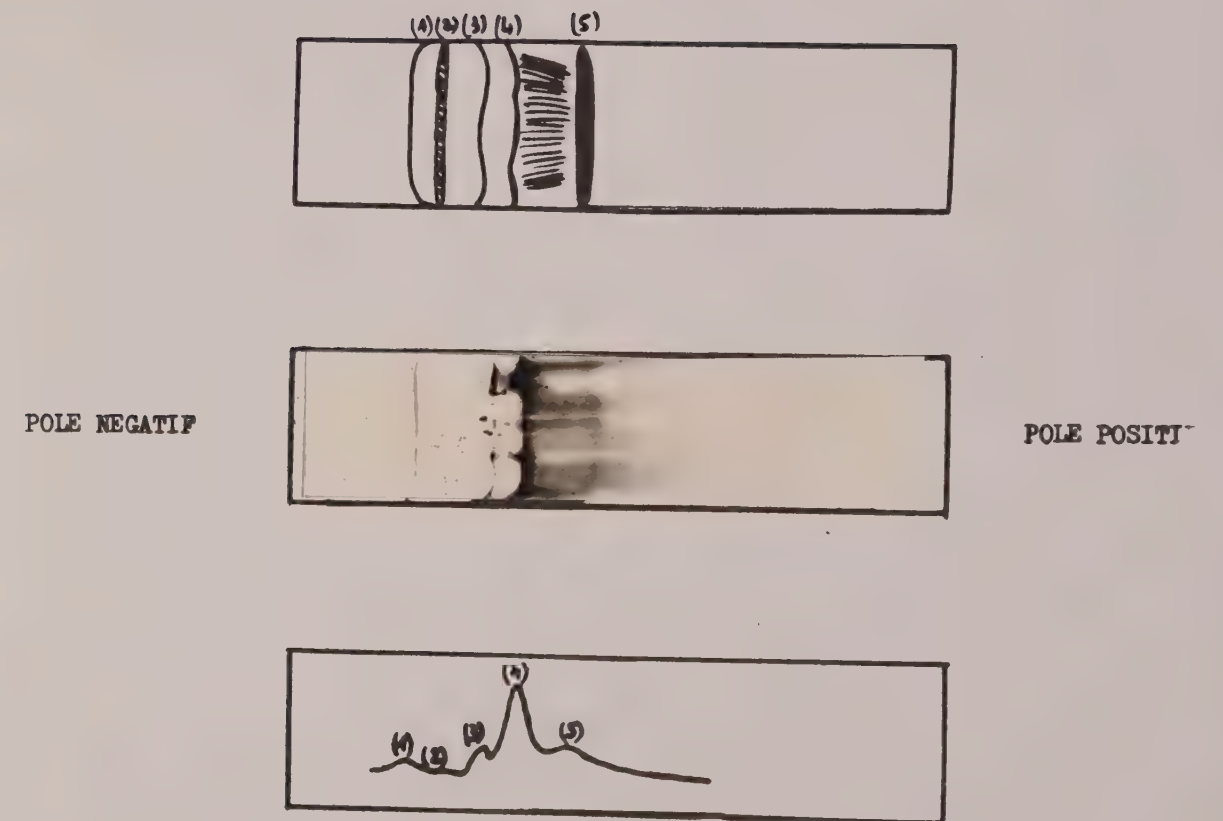
2- Une légère différence au niveau de la quatrième bande .

La bande n° 4 est simple pour le tissu sain, elle est dédoublée pour le tissu tumoral, et l'image présentée à l'électrophorèse fait penser à une protéine plus ou moins particulière. Les



SCHEMA N° 5

Electrophorèse des protéines de mitochondries
de la tumeur mammaire , après extraction par
le Dodécyl sulfate.



SCHEMA N° 6

Electrophorèse des protéines de mitochondries
des glandes mammaires , après extraction par
le Dodécyl sulfate.

courbes obtenues³ avec un appareil intégrateur n'ont pas permis de mettre en évidence cette différence de façon très précise, mais nous l'avons illustrée sur le schéma n° 5 en l'exagérant .

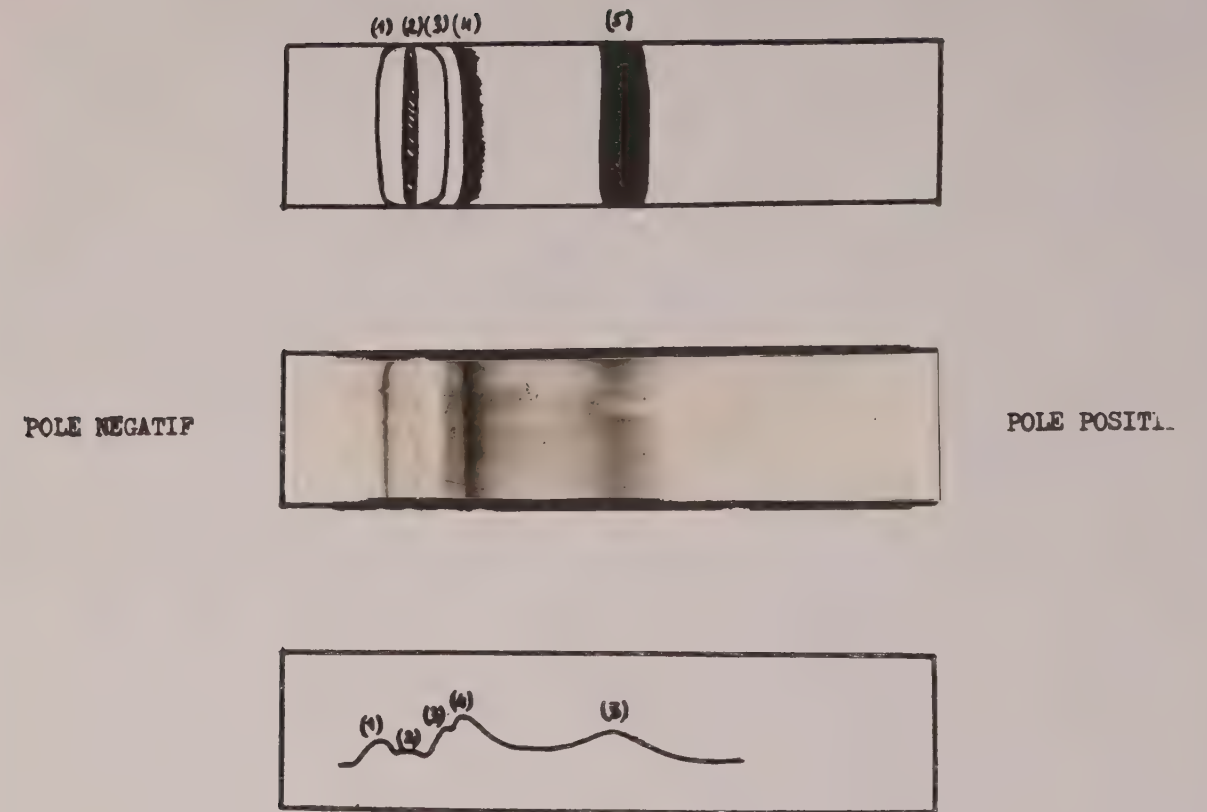
L'analyse comparative des électrophorèses faites après traitement par le Duponol, montre que les deux électrophorèses ne présentent aucune différence significative, et qu'elles se rapprochent beaucoup de celles obtenues après traitement par le Dodécyl Sulfate. Les tracés laissent à penser que ces deux détergents ont, vis à vis des protéines de mitochondries, le même mode d'action.

L'analyse comparative des électrophorèses obtenues après traitement par le Désoxycholate de Sodium permet de noter une différence sensible avec les résultats précédents. En effet, on trouve avec ce traitement, une fraction de moins, mais la fraction n° 3 est beaucoup plus particulière. En outre, il n'y a aucune différence significative entre les tracés obtenus avec le tissu sain et avec le tissu tumoral .

Les résultats obtenus après traitement par le Lubrol et le Triton ne figurent pas car ils n'apportent rien de plus. En fait, avec ces deux détergents on n'obtient que deux fractions : une fraction anodique et une fraction cathodique.

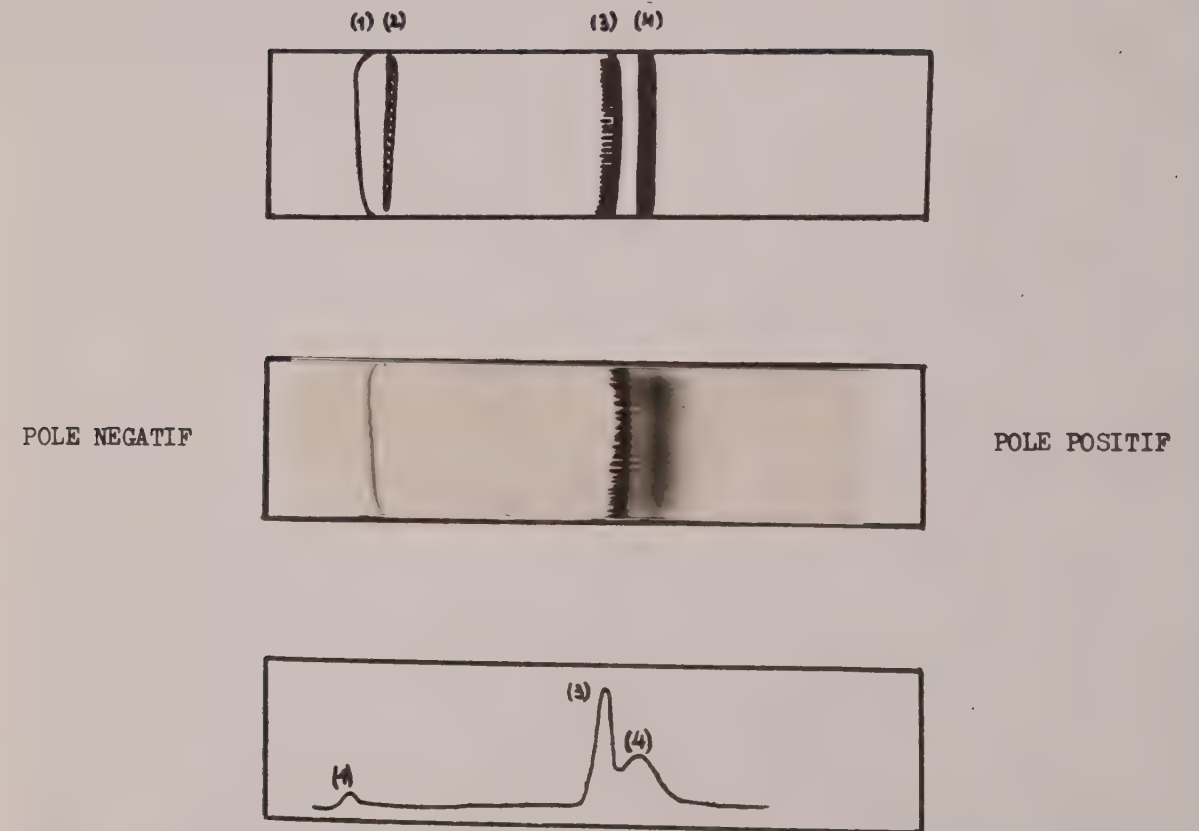
III - Discussion des résultats obtenus

Il ressort de notre étude, qu'avec les détergents utilisés pour rompre les membranes des mitochondries, et solubiliser les protéines mitochondriales, nous avons réalisé une meilleure séparation électrophorétique avec le Dodécyl Sulfate, à savoir : cinq fractions avec le tissu sain et six fractions avec le tissu tumoral. La similitude du tracé électrophorétique obtenu après traitement par le Duponol, et le fort pourcentage d'extraction des protéines doivent rapprocher ce détergent du précédent. Par contre le Lubrol et le



SCHEMA N° 7

Electrophorèse des protéines de mitochondries
provenant de la tumeur ou du tissu sain, après
extraction par le Duponol.



SCHEMA N° 8

Electrophorèse des protéines de mitochondries
provenant de la tumeur ou du tissu sain, après
extraction par le Désoxycholate.

Triton X 100 ne semblent pas apporter de renseignement particulier .

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de publications relatant des différences électrophorétiques entre les protéines de mitochondries de tissu sain et de son homologue tumoral. Les études faites ont porté seulement sur des tissus sains, notamment le foie de rat. D'AMELIO (2) pour ce dernier type de tissu, trouve trois groupes de protéines après traitement par le Désoxycholate de Sodium, en utilisant un support gélosé .

Les différences trouvées avec les divers agents tensio-actifs, reposent sur la formation de complexes entre les protéines présentes et le détergent utilisé. C'est la raison pour laquelle la migration se fait vers l'anode et vers la cathode, chaque complexe protéine-détergent ayant une charge électrique qui lui est propre, et une mobilité différente des autres .

LUNGREEN (63) a pu faire la démonstration de la combinaison protéine-détergent, grâce à une étude faite sur l'albumine de l'oeuf. Le détergent utilisé migre seul, comme un composé de poids moléculaire assez élevé. Cette mobilité correspond à celle des micelles. Si on ajoute de l'ovalbumine de telle sorte que le rapport détergent-protéine (D/P) soit inférieur à 0,3, le pic de détergent disparaît, et on note à l'électrophorèse libre deux pics de moindre intensité, le plus lent correspondant à l'ovalbumine, le plus rapide correspondant à un complexe protéine-détergent. Si le rapport D/P augmente, la proportion du pic le plus rapide augmente également, mais les mobilités des deux pics restent constantes, preuve d'une composition constante .

Donc, si l'on ajoute une quantité limitée de détergent, celui-ci s'allie à une partie des molécules protéiques pour donner un complexe stoechiométrique plutôt que de se distribuer de façon équivalente aux molécules protéiques disponibles. Mais quand le rapport D/P excède la valeur correspondant à la formation complète stoechiométrique, une deuxième sorte de liaison apparaît, pour laquelle le détergent se distribue uniformément à toutes les molécules protéiques disponibles. LUNGREEN a donné à ce type de liaison le nom de "liaison supplémentaire du détergent".

Ces résultats ont été retrouvés par TIMASHEEF et NORD (89) en 1951, par PALLANSCH et BRIGGS (75) en 1954 et par FOSTER et YANG en 1953 et en 1954 (30) (100).

Il ressort de ces différentes recherches que la concentration en détergent et la concentration en protéine présentent une importance particulière pour l'étude électrophorétique. D'AMELIO (2), UGAZIO (90) et CONGIU (24), ayant fait des essais avec différentes concentrations des détergents, nous avons respecté les conditions opératoires qu'ils préconisent.

Le mode d'action des détergents explique enfin l'existence d'une fraction protéique migrant du côté cathodique alors que les autres fractions migrent du côté anodique. Il s'agit alors simplement d'une question de charge électrique du complexe formé .

CONCLUSIONS DU CHAPITRE I

En utilisant différents détergents pour rompre les membranes des mitochondries et solubiliser leurs protéines, nous avons pu mettre en évidence les points suivants :

- 1°) Le Dodécyl Sulfate est le meilleur agent tensio-actif pour solubiliser les protéines des mitochondries.
- 2°) Le Duponol doit avoir un mode d'action très voisin de celui du Dodécyl Sulfate.
- 3°) L'électrophorèse sur Cellogel du résultat du traitement par le Dodécyl Sulfate permet de montrer une différence entre le tissu sain et le tissu tumoral. Il s'agit d'une bande supplémentaire qui semble être due au dédoublement d'une protéine des mitochondries issues du tissu sain .
- 4°) Le traitement par le Désoxycholate de Sodium montre à l'électrophorèse une bande de protéines que l'on peut qualifier de "particulaire" .
- 5°) Les autres agents utilisés : Lubrol et Triton X 100 ne donnent pas les résultats de ceux précédemment cités.

Afin de mieux comprendre la différence décelée à l'électrophorèse entre les protéines des mitochondries du tissu sain et celles du tissu tumoral, nous avons entrepris une étude immunologique qui constituera la troisième partie de ce travail .

C H A P I T R E I I

ETUDE CHIMIQUE DU CONTENU MITOCHONDRIAL

Extraction, dosage et étude chromatographique des lipides des mitochondries isolées de la tumeur mammaire et des glandes mammaires .

A - I N T R O D U C T I O N

Les lipides comprennent des corps divers caractérisés par leur solubilité dans les solvants organiques apolaires. Ce sont des esters d'acides gras. Les acides gras sont généralement des monoacides à chaîne normale et à nombre pair d'atomes de carbone. Ils peuvent être saturés comme les acides palmitique et stéarique, soit mono-insaturés comme les acides palmitoléique et oléique, soit poly-insaturés comme les acides linoléique et arachidonique.

On peut distinguer :

a) les lipides simples qui sont

- soit des esters d'acides gras et du glycérol comme les glycérides
- soit des esters d'acides gras et du cholestérol comme les stérides

b) les lipides complexes qui se divisent en :

- glycérophospholipides comme les céphalines et les lécithines

-sphingolipides comme les sphingomyélines qui sont également des lipides phosphorés.

c) les acides gras.

L'étude du contenu lipidique des mitochondries débute en 1960 par les travaux de Mac FARLANE (65) sur la composition des phospholipides des organites sub-cellulaires du foie de rat.

Cette étude est complétée par GETZ et ses collaborateurs (33) en 1961 et (34) en 1962, toujours à partir des mitochondries de foie de rat.

En 1962, EMELOT (27) puis VEERKAMP (91) étudient, le premier le contenu lipidique des tissus néoplasiques néoplasiques et le second, certaines comparaisons entre le contenu lipidique des tissus sains et des tissus tumoraux.

L'étude de la Malignolipin par les chercheurs Japonais en 1960, notamment KOSAGI et ses collaborateurs (55) et en 1962 par KAMAT (51), amenèrent OKAMURA (73) à proposer une technique de détection de la Malignolipin dans le sang. Cette étude fut par la suite reprise et modifiée par SARACINO et ses collaborateurs (83).

La richesse des publications sur le contenu lipidique des tumeurs et des organites sub-cellulaires, nous a incité à faire l'étude comparative du tissu mammaire sain et tumoral .

B - PROTOCOLE GENERAL D'ETUDE

I - Méthode d'extraction

Nous avons donné la préférence à une technique dérivée de celle de FOLCH (29) qui permet par un partage de phase, d'obtenir un extrait lipidique débarrassé de la majorité des contaminants. La technique générale a été la suivante :

Un culot de mitochondries est repris par 1 ml d'eau distillée. Cette suspension est mise en contact avec 20 ml d'une solution de chloroforme -Méthanol dans la proportion de 2 volumes de chloroforme pour 1 volume de Méthanol. Elle est agitée énergiquement pendant 2 minutes et laissée au repos pendant une heure. Elle est ensuite centrifugée , le culot de centrifugation est alors extrait à nouveau par 9 ml de la solution Chloroforme - Méthanol précédemment citée.

Les extraits sont rassemblés, filtrés sur filtres sans graisse. Le filtre est soigneusement rincé avec un volume de la solution d'extraction.

L'extrait (environ 35 ml) est additionné de 6 à 10 ml d'une solution de Chlorure de Calcium 2 mM. La solution est alors agitée énergiquement ; après séparation parfaite des phases, la majeure partie de la phase aqueuse supérieure est éliminée par aspiration à la trompe à vide. Le reste de la phase aqueuse est éliminé par trois rinçages soignés des parois et de la surface effectués avec un liquide de rinçage préparé de la manière suivante :

8 volumes de chloroforme sont mélangés par agitation avec 4 volumes de Méthanol et 3 volumes d'eau distillée. Après séparation des phases, la phase aqueuse supérieure est récupérée et additionnée de 2,9 grammes

de Chlorure de Sodium par litre de phase aqueuse récupérée. Cette phase supérieure sert aux lavages. Après ces lavages, la phase inférieure chloroformique contenant les lipides, et le reste des lipides de lavage sont réunis en une seule phase par addition juste suffisante de Méthanol .

Une fraction convenable d'extrait lipidique chloroformique est évaporée à sec, sous vide, dans une petite capsule, et le résidu est repris en plusieurs fois par un peu du mélange chloroforme-Méthanol. Cet extrait est ensuite placé dans une petite capsule de verre préalablement tarée. On évapore et on place en dessiccateur. On pèse jusqu'à poids constant ; le taux de lipides est ainsi déterminé par gravimétrie .

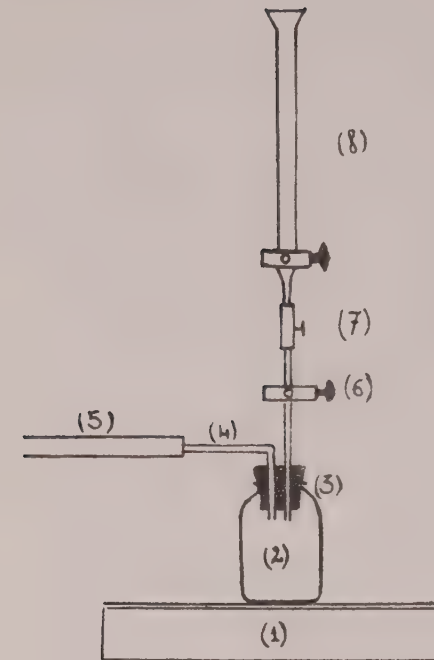
Une autre fraction est placée dans un système d'évaporation sous vide à + 40° C, permettant de reprendre l'évaporat sans entré d'air, ainsi que le conseille NUSSBAUM et MANDEL (72). Le système utilisé est décrit sur le schéma n° 9. Il permet d'éviter l'oxydation de certains composés lipidiques par l'oxygène de l'air.

Cette fraction est reprise par de l'Hexane pur et est soumise aux fractionnements chromatographiques.

II - Méthode de fractionnement

Nous avons utilisé dans cette étude deux types de fractionnements chromatographiques :

- 1 - La chromatographie sur colonnes selon la technique d'HANAHAN (39) légèrement modifiée qui permet de fractionner le contenu lipidique en trois groupes de lipides.
- 2 - la chromatographie en couches minces, permettant de séparer les différentes fractions lipidiques de chaque groupe précédemment isolé (Procédé DESAGA) .



- (1) Plaque chauffante d'histologie
- (2) Récipient de taille variable
- (3) Bouchon caoutchouc à deux voies
- (4) Tube coudé
- (5) Caoutchouc à vide, relié à la trompe à eau.
- (6) Robinet émeri à deux voies
- (7) Raccord en plastique souple
- (8) Burette graduée de 5 ml

SCHEMA N° 9

Système d'évaporation sous vide,
 permettant de reprendre l'évaporat
 sans entrée d'air.

I - La chromatographie sur colonnes

Il s'agit d'une chromatographie sur colonne d'acide silicique avec de très petites quantités de lipides. Aussi avons nous été amené à modifier sensiblement la technique proposée par BARRON et HANAHAN (8) qui a été reprise en partie par NUSSBAUM et MANDEL (72) et également par MAC FARLANE (65).

L'acide silicique Mallinckrodt (100 mesh) est lavé avec de l'éther puis avec un mélange Benzène-Hexane dans la proportion de 15 volumes de Benzène pour 85 volumes d'Hexane, enfin avec de l'Hexane pur.

L'acide silicique est alors déposé en suspension dans l'Hexane à raison de 0,8 g dans une colonne constitué par une pipette de 5 ml dont l'extrémité est garnie d'une petite bourre de laine de verre. Le diamètre intérieur de cette colonne est d'environ 6 mm .

La confection de ces colonnes est une opération délicate dont dépend la vitesse d'écoulement et l'efficacité des séparations. La hauteur de la couche d'acide silicique est de 4 cm environ. Lorsque l'Hexane , ayant servi à déposer l'acide silicique atteint presque le niveau supérieur du gel, les lipides à fractionner y sont déposés à raison de 1 ml d'Hexane pour 10 à 15 mg de lipides.

La colonne doit être rigoureusement verticale . Dès que la solution lipidique est absorbée, la chromatographie est mise en route, conformément aux indications ci-après (voir schéma n° 10) :

On place au-dessus de la colonne un réservoir d'une capacité d'environ 50 ml relié par un raccord en plastique souple muni d'une pince de débit, à une tige raccord en verre qui plonge dans la colonne jusqu'à environ $\frac{1}{2}$ cm au-dessus du lit d'acide silicique. Cette condition de proximité est importante pour éviter le trouble du lit d'acide silicique lorsque la chromatographie est mise en route .



- (1) Réservoir de l'éluant : capacité 50 ml
- (2) Raccord en plastique souple, muni d'une pince de débit, et plongeant jusqu'à $\frac{1}{2}$ cm au dessus de la silice.
- (3) Pipette de 5 ml graduée. Diamètre intérieur voisin de 6 mm.
- (4) Eluant situé au dessus de la silice.
- (5) Acide silicique.
- (6) Laine de verre.
- (7) Raccord en plastique souple, muni d'une pince de débit
- (8) Aiguille fine.

Le premier éluant utilisé est un mélange Benzène-Hexane à raison de 15 parties de Benzène pour 85 parties d'Hexane. Ce réactif permet l'élution des stérides. On utilise pour cette élution 20 ml de réactif .

Le second éluant utilisé est un mélange Chloroforme - Ether à parties égales. Le chloroforme doit être lavé à l'eau puis déshydraté par le Sulfate de Sodium anhydre, car il contient de l'alcool Ethylique. On utilise pour cette élution 15 ml de réactif. Il permet la récupération des glycérides du cholestérol, et des acides gras libres.

Le troisième éluant est composé de Méthanol pur qui permet de récupérer les Phosphatides. On utilise pour l'élution 20 ml de Méthanol pur .

Il est ainsi recueilli trois fractions de volume respectif : 20 ml, 15 ml, 20 ml. Ces fractionnements de lipides sur couche mince de Silicagel seront opérés à partir de ces éluats .

2 - La chromatographie sur couches minces

a) Principe

Une couche adsorbante de faible épaisseur, est déposée sur une plaque de verre. Les composés à séparer sont disposés à l'extrémité inférieure de la plaque qui est placée dans une enceinte fermée, saturée en vapeurs d'un solvant de migration choisi. On laisse celui-ci migrer par capillarité sur la couche mince. Le solvant et les solutés entrent en compétition pour l'occupation des sites d'adsorption.

b) Préparation des plaques

Pour le fractionnement des lipides, nous utilisons le gel de Silice G Merck contenant du plâtre en guise de liant. Un étaleur spécial permet de répartir une couche mince uniforme de 0,3 mm d'épaisseur sur des plaques de verre (Procédé Desaga). Les plaques utilisées doivent être parfaitement planes et

carrées de 20 cm de côté.

L'adsorbant s'obtient en mélangeant au mortier 30 g de gel avec 60 ml d'eau distillée. Dès l'addition de l'eau, on dispose de 4 minutes pour la préparation de 5 plaques placées côte à côte sur un support spécial et préalablement préparés. Le dépôt effectué, on laisse le revêtement se solidifier et sécher à l'air libre. La dessiccation est terminée par un passage de 30 minutes dans une étuve à 110° C, de façon à obtenir un degré précis d'activation de la silice. Les plaques sont ensuite conservées dans un dessiccateur.

Nous avons également utilisé la chromatographie en couches mince fluorescente. Pour cela, le gel de silice est préparé non plus avec de l'eau distillée mais avec 60 ml d'une solution de fluorescéine contenant :

Fluorescéine R.A.L.	20 mg
NaOH 0,1 N	1,2 ml
Eau Distillée	q.s.p 60 ml

La révélation de la plaque après la migration se fait alors au moyen de vapeurs de brome. La plaque rougit par formation d'un dérivé bromé (Mercuréscéine), tandis que les tâches de substances non saturées apparaissent en jaune et présentent une fluorescence intense vert-jaune dans l'ultra-violet.

Ce mode de révélation ne laissant apparaître que les composés non saturés, la plaque est ensuite placée dans une enceinte saturée en iode. Cette saturation en iode est obtenue en disposant des cristaux d'iode dans une enceinte hermétiquement fermée. Les composés saturés apparaissent en marron foncé sur fond rouge. Le principal inconvénient de cette méthode réside dans le fait que lorsqu'on sort la plaque de l'enceinte saturée en iode, les tâches brunes disparaissent au contact de l'air. Il semble aussi que ces couches minces aient une adhérence moins bonne que celles qui sont préparées sans fluorescéine.

c) Chromatographie proprement dite

Pour la séparation des diverses classes de lipides, nous avons adopté un protocole voisin de celui proposé par BOWYER et ses collaborateurs (15). Une partie aliquote de chaque éluat obtenu par chromatographie sur colonnes, est déposée, en gouttes rapprochées, sur le gel de silice préalablement séparé en plusieurs pistes pour éviter les déplacements latéraux du solvant de migration.

Auparavant, chacun des trois éluats obtenus a été évaporé sous vide et repris sans entrée d'air dans l'appareil décrit précédemment, (schéma n° 9), par 5 ml de chloroforme.

Parallèlement, sur une piste témoin, nous avons déposé les composés qui, mélangés à parties égales, nous ont servi d'étalonnage, à savoir :

- du cholestérol en solution dans le Chloroforme à raison de 60 mg pour 100 ml
- du stéarate de cholestérol , en solution dans le Chloroforme à raison de 60 mg pour 100 ml,
- de la tributyrine, en solution dans le Chloroforme, à raison de 50 mg pour 100 ml,
- de l'acide palmitique, en solution dans le Chloroforme, à raison de 50 mg pour 100 ml
- du monolaurate de glycérol, en solution dans le chloroforme à raison de 50 mg pour 100 ml.

Ces témoins nous permettent de déceler ainsi dans l'ordre, le cholestérol, les stérides, les triglycérides, les acides gras, et enfin les monoglycérides.

Ce mélange témoin pour Stérides et graisses neutres a été déposé à raison de 50 microlitres par piste.

En ce qui concerne les lipides phosphorés, nous avons utilisé le mélange témoin suivant :

- de la céphaline animale en solution chloroformique à 50 mg pour 100 ml
- de la lécithine animale en solution chloroformique à 50 mg pour 100 ml .

Une première chromatographie sur plaques avec le mélange témoin pour graisses neutres nous a donné l'ordre d'apparition des différents composés utilisés (schéma n° 11). Il en a été de même pour les phospholipides (Schéma n° 12).

Les solvants de migration utilisés ont été les suivants :

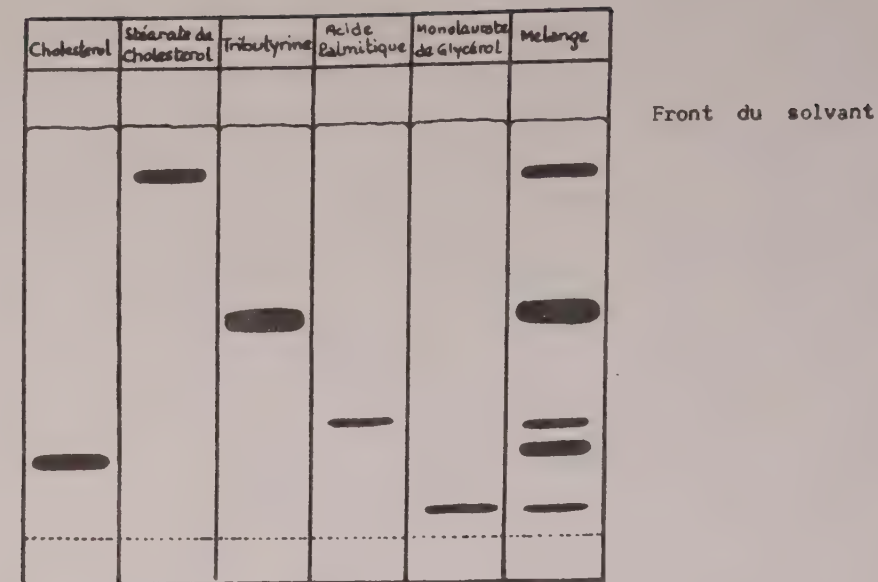
- Pour les graisses neutres :

Ether de pétrole	90 vol.
Ether Éthylique	10 vol.
Acide acétique	1 vol.

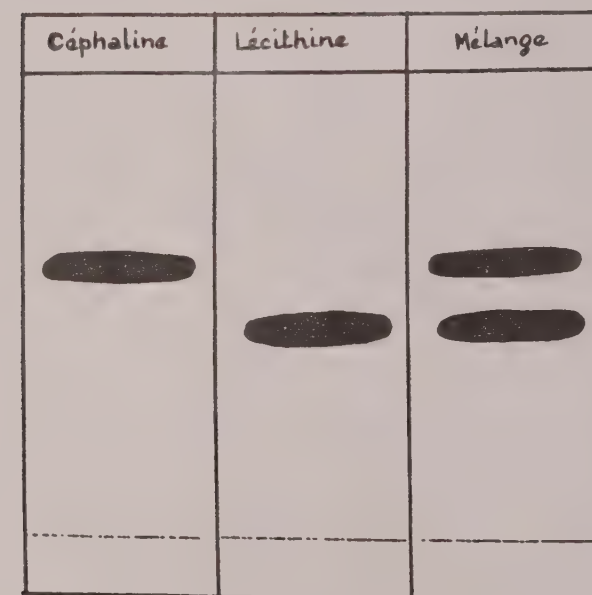
- Pour les lipides phosphorés :

Chloroforme	65 vol.
Méthanol	25 vol.
Eau distillée	4 vol.

La chromatographie est ascendante, elle est arrêtée au bout d'une heure environ lorsque le front du solvant s'est déplacé de 12 à 15 cm. Après évaporation du solvant, les différents lipides sont révélés selon diverses techniques.



SCHEMA N° 11 : Migration comparée des témoins de lipides neutres et de leur mélange.



SCHEMA N° 12 : Migration comparée des témoins de phospholipides et de leur mélange.

d) Révélation des composés lipidiques sur les chromatogrammes

Pour les révélations globales , il a été utilisé une solution aqueuse de Rhodamine 6 G à la dose de 1 mg pour 100 ml . La lecture est faite en lumière de Wood, qui révèle la quasi totalité des lipides sous forme de tâches fluorescentes jaunes. La révélation peut être faite sous forme de tâches marron clair en plaçant la plaque pendant quelques minutes dans une enceinte saturée de vapeurs d'iode comme indiqué précédemment .

Pour les révélations plus spécifiques, il peut être fait appel à la pulvérisation de réactifs spécifiques de certains composés lipidiques.

* pour les composés stéroliques, il est utilisé une pulvérisation du mélange suivant :

Anhydride acétique 4vol.
Acide sulfurique 1 vol.

Un chauffage à 110° C pendant 15 minutes termine l'opération. Le cholestérol et les stérides apparaissent sous forme de tâches pourpres, tandis qu'un début de carbonisation fait ressortir les autres fractions en brun .

* pour les phospholipides, on peut réaliser la pulvérisation d'un réactif dont la composition est la suivante :

Molybdate d'ammonium 3 g
Eau distillée 25 ml

Solubilisation soignée, puis addition :
Acide Chlorhydrique N 30 ml
Acide perchlorique con. 15 ml

Après pulvérisation, un passage de la plaque à 110°C pendant 20 minutes fait apparaître les phospholipides en gris bleu sur fond gris.

* pour les céphalines, emploi d'une solution de Ninhydrine à 0,2 % dans le mélange suivant :

Butanol 95 vol.

Acide Acétique 10% ... 5 vol.

Puis chauffage de la plaque à 105° C pendant 20 minutes faisant apparaître les céphalines sous forme de tâches violettes.

Pour l'identification des fractions, la meilleure méthode opératoire reste encore l'utilisation concomitante des étalons de référence, préalablement identifiés comme le montrent les schémas n° 11 et n° 12 .

C - RESULTATS OBTENUS

I - Résultats concernant le taux des lipides totaux

Le taux moyen de lipides de mitochondries a été trouvé

- de 18,7 mg par gramme de tumeur humide
- de 3,3 mg par gramme de glandes mammaires humides

Le rapport entre les lipides de la tumeur et ceux des glandes mammaires saines est donc de 5,66 alors qu'il était de 6,14 pour les protéines. Ces deux rapports sont très voisins l'un de l'autre .

Le rapport protéine/lipides est également très voisin : 0,38 pour la tumeur mammaire, et 0,34 pour les glandes mammaires normales. (Voir tableaux n° 7 et n° 8).

Dans ces calculs, nous avons repris le taux moyen des protéines, tel qu'il apparaît dans les résultats précédents (tableaux n° 3 et n° 6), c'est à dire :

7,2 mg par gramme de tumeur

1,13 mg par gramme de glande mammaire.

II - Résultats concernant le fractionnement des lipides

Les trois éluats obtenus par chromatographie sur colonne ont été évaporés puis repris par 5 ml de Chloroforme dans les conditions décrites précédemment. Ils ont été soumis ensuite aux chromatographies sur couches minces avec les deux solvants de migration, à savoir :

poids humide de TUMEUR	Nombre de culots	poids de lipides pesé après tt d'un culot	poids total de lipides	Taux de lipides par gramme de Tumeur	Rapport: <u>mg Protéines</u> <u>mg Lipides</u>
19	8	45 mg	360 mg	18,9 mg	0,38
16,5	8	39 mg	312 mg	18,9 mg	0,38
21	8	48 mg	384 mg	18,3 mg	0,39

Tableau N° 7 : Taux de lipides des mitochondries
de la tumeur mammaire.
Rapport Protéines / Lipides par
gramme de tumeur.

Poids humide de glandes	Nombre de culots	poids de lipides pesé après tt d'un culot	poids total de lipides	taux de lipides par gramme de glandes	Rapport <u>mg Protéines</u> <u>mg Lipi es</u>
42	6	24,5 mg	147 mg	3,5 mg	0,32
37	6	19 mg	114 mg	3,1 mg	0,36

Tableau N° 8 : Taux de lipides des mitochondries
des glandes mammaires.
Rapport Protéines / lipides

pour les lipides neutres, le solvant Ether de pétrole
Ether Acide Acétique,

pour les Phospholipides, le solvant Chloroforme -
Méthanol - Eau .

La fraction A, première fraction recueillie, ne devrait renfermer que les stérides, la Fraction B, que les lipides neutres, la fraction C, que les phospholipides.

En fait, une première constatation s'impose : à part la fraction C qui ne renferme que des phospholipides, les autres fractions renferment certains constituants de la fraction suivante .

Ainsi, la fraction A renferme les stérides et une petite partie de Triglycérides.

La fraction B renferme des stérides et une petite partie des phospholipides qui ne migrent pas avec le solvant des graisses neutres, mais qui migrent avec celui des phospholipides.

Cette contamination est cependant peu importante au plan qualitatif qui nous occupe. Elle serait beaucoup plus gênante si nous avions abordé une étude quantitative .

1 - Différents types de lipides neutres (Schémas n° I3 - I4)

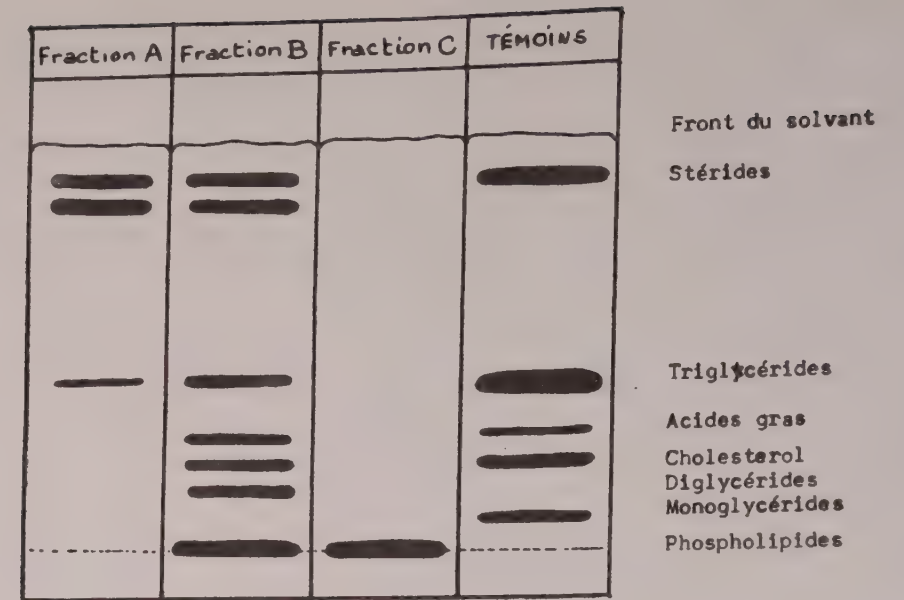
Premier résultat à indiquer :

Il n'y a pas de différences qualitatives entre les lipides neutres des mitochondries de la tumeur mammaire et celles des glandes mammaires normales.

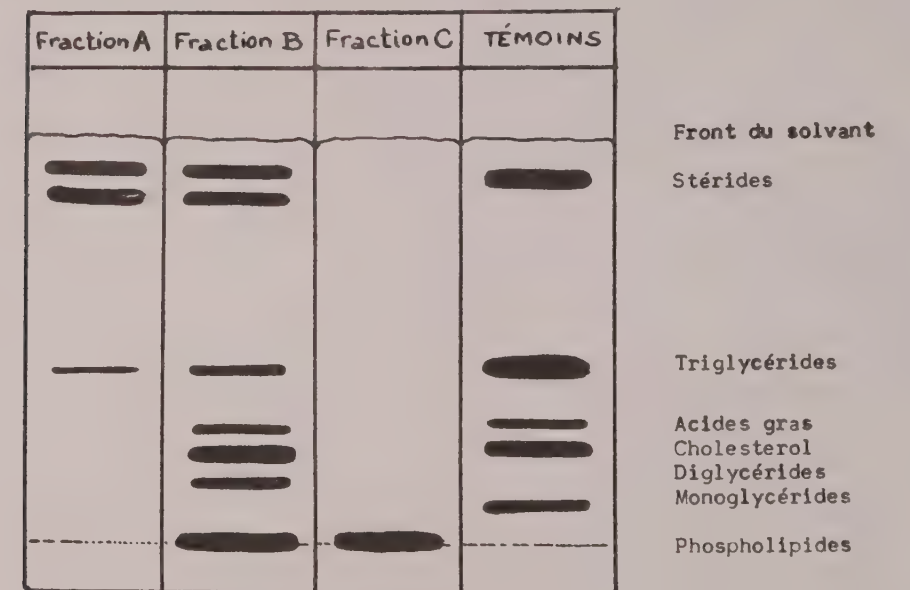
Points particuliers à souligner :

par ordre de migration croissant, nous avons trouvé :

- des diglycérides
- du cholestérol
- des acides gras libres



SCHEMA N° 13 : Fractionnement sur couche mince des lipides neutres des mitochondries de la tumeur mammaire.



SCHEMA N° 14 : Fractionnement sur couche mince des lipides neutres des mitochondries des glandes mammaires.

- des triglycérides
- des stérides.

dans les deux cas, il y a deux bandes de stérides ainsi que l'a prouvé la pulvérisation du mélange acide permettant la révélation spécifique des composés stéroliques.

2 - Différents types de phospholipides (Schémas n° I5-I6)

Là encore, aucune différence qualitative n'a pu être décelée.

La fraction B renferme en petite quantité, les mêmes fractions lipidiques que la fraction C. Dans ce type de chromatographie, les lipides neutres migrent en même temps que le front du solvant, sans se séparer .

Les fractions trouvées sont les suivantes :

- Céphalines
- Lécithines
- Lysolécithines

Céphalines et Lécithines ont migré comme les témoins. Pour la troisième fraction, les lysolécithines, nous avons fait appel à la pulvérisation d'un réactif permettant la révélation des composés choliniques, et de composition :

Solution de sous-nitrate de Bismuth	
à 1,7 % dans l'acide acétique à 20 %	20 ml
Solution aqueuse d'Iodure de Potassium	
à 40 %	5 ml
Eau distillée	70 ml

Les composés choliniques sont révélés par une coloration brun ocre. Les Lécithines et Lysolécithines sont les seuls produits lipidiques renfermant de la choline .

3 - Nous avons également utilisé la technique de chromatographie en couche mince dite "fluorescente". Nous n'avons noté aucune différence notable avec la révélation par la solution de Rhodamine 6 G. En fait, il s'agit là d'une technique élégante pour la révélation mais qui n'apporte rien de plus. Par ailleurs, il semble que l'adhérence de la couche mince soit bien diminuée.

Les révélations à l'iode n'ont pas apporté d'éléments complémentaires.

DISCUSSION des RESULTATS

Les résultats qualitatifs de cette étude des lipides des mitochondries n'apportent pas d'éléments nouveaux dans les connaissances relatives aux mitochondries que l'on possédait jusqu'à maintenant . En fait, ce qui est important réside dans les remarques suivantes :

- 1 - L'étude comparative du contenu lipidique des mitochondries des glandes mammaires et de la tumeur mammaire n'avait jamais été faite .
- 2 - L'étude des lipides de mitochondries en couches minces, si elle est citée par certains auteurs, n'a jamais été publiée .
- 3 - Par contre, bon nombre d'auteurs se sont surtout intéressés aux phospholipides des mitochondries, ceux-ci constituant une bonne part de la membrane (1/5) .

D'après GETZ et BARTLEY (34), les mitochondries de foie de rat renferment 26 % de lipides. Céphalines et lécithines sont trouvées à parties égales, chacune représentant 38 % des lipides phosphorés. Les 24% restant étant composés par de la cardiolipine , qui se trouve trois à cinq fois plus concentrée dans les mitochondries que dans l'homogénat cellulaire .

Rappelons pour mémoire que

- | | |
|----------------|----------------------------|
| - Céphaline | = Phosphatidyléthanolamine |
| - Lécithine | = Phosphatidylcholine |
| - Cardiolipine | = Polyglycérophosphatide |

La révélation des fractions lipidiques obtenues par l'intermédiaire d'un solvant de migration neutre, ne pouvait donner une meilleure séparation que celle que nous avons obtenue. Il aurait été cependant intéressant d'utiliser des solvants de migration alcalins ou acides comme l'a fait CRASTES de PAULETS (25) selon HORROKS.

Avec les solvants alcalins, tel le mélange Chloroforme-Méthanol - Ammoniaque, on peut séparer les phospholipides en cinq à huit fractions à savoir :

- Lysolécithine
- Sphingomyéline
- Lécithine
- Céphaline
- Lysocéphaline
- Phosphatidylsérine
- Phosphatidylinositol
- Acide phosphatidique

Avec les solvants de migration acides, on peut obtenir une séparation des phospholipides en cinq fractions, à savoir :

- Lysolécithine
- Sphingomyéline
- Lécithine
- Phosphatidylsérine
- Phosphatidyléthanolamine

D'autres modifications sont possibles et parfaitement décrites dans le travail de CRASTES DE PAULETS (25) à propos des phospholipides plasmiques. Signalons notamment l'utilisation d'un adsorbant acidifié ou alcalinisé, et d'un solvant neutre. En pratique, il est rare d'isoler grâce à un seul système tous les phospholipides existant dans l'extrait à analyser, et la plupart des auteurs utilisent conjointement plusieurs méthodes.

Comme notre étude du contenu lipidique des mitochondries est seulement qualitative, il ne nous est pas permis d'effectuer des comparaisons avec les résultats obtenus par GETZ (33) ou MAC FARLANE (65), ou encore NUSSBAUM (72) qui ont étudié de manière plus quantitative un sujet beaucoup plus restreint, comme, par exemple, la Sphingomyéline dans les mitochondries de cerveau, ou la composition en acides gras des phospholipides extraits des mitochondries de foie de rat.

E - CONCLUSIONS CONCERNANT L'ETUDE DU CONTENU LIPIDIQUE

A la lumière des résultats précédemment cités, on peut formuler différentes conclusions :

- 1 - Les mitochondries du tissu tumoral mammaire et de son homologue sain renferment une quantité de lipides relativement importante puisqu'il y a par gramme de tumeur, 2,6 fois plus de lipides que de protéines et par gramme de tissu sain, 2,8 fois plus de lipides que de protéines .
- 2 - La comparaison des rapports Protéines-Lipides dans les deux types de tissus montre qu'ils sont très voisins, respectivement 0,38 et 0,34 comme l'indiquent les tableaux n° 7 et n° 8 .
- 3 - Nous n'avons pas trouvé de différences qualitatives. Cependant une étude quantitative , techniquement possible avec les procédés récents, ne pourrait être entreprise que si l'on disposait des moyens permettant d'obtenir , en quantité suffisante le matériel à examiner. Cette étude montrerait sans doute que certaines fractions lipidiques, notamment les phospholipides, sont quantitativement différentes et cela de façon statistiquement significatives .

L'étude des lipides que nous avons entreprise, était motivée par plusieurs raisons :

- 1 - Les lipides représentent une forte proportion du contenu mitochondrial, c'est pourquoi, il nous a semblé important de les étudier.

2 - Il est certain que les lipoprotéines jouent un rôle important dans les réactions enzymatiques au sein des mitochondries. Ces lipoprotéines sont en effet, situées entre certaines sections de la chaîne respiratoire du transfert électronique de sorte qu'un fragment de cette chaîne réagit avec le suivant par l'intermédiaire du segment lipoprotéique.

Dans ces lipoprotéines, le co-enzyme ^Q a été mis en évidence. Cette molécule est une benzoquinone à chaîne poly-isoprénique, participant activement aux réactions de transfert électronique.

3 - Enfin, dernier point à souligner; la membrane des mitochondries est composée pour les 4/5 par une protéine de constitution et pour le 1/5 restant par des phospholipides.

TROISIEME PARTIE

ETUDE IMMUNOLOGIQUE COMPARATIVE DES MITOCHONDRIES ISOLEES
DE LA TUMEUR MAMMAIRE DE LA SOURIS DE LIGNEE C₃H ET DU TISSU
SAIN CORRESPONDANT.

A - I N T R O D U C T I O N

Nous avons vu précédemment que l'étude électrophorétique comparée, des protéines mitochondriales de la tumeur d'une part et du tissu sain homologue d'autre part permet de déceler le dédoublement d'une fraction dans le tissu tumoral.

Pour essayer d'identifier et de mieux individualiser cette différence, nous avons fait appel à des techniques immunologiques, techniques des plus élégantes, à condition toutefois que les protéines présentent une différence antigénique susceptible de donner naissance à des anticorps différents.

Dans notre travail, le simple dédoublement d'une fraction électrophorétique peut sembler insuffisant pour espérer obtenir une différence d'antigénicité. Nous l'avons néanmoins tenté en utilisant les techniques de double diffusion en gélose .

o

o o

B - PREMIERE SERIE D'ESSAIS IMMUNOLOGIQUES

I - Matériel et Méthodes

1- Préparation des antigènes pour la production d'anticorps

Pour obtenir les meilleurs résultats, nous avons adapté à notre travail la méthode utilisée par d'AMELIO et ses collaborateurs (2) dans son étude immunologique des mitochondries de foie de rat.

Les mitochondries ont été isolées, comme nous l'avons décrit précédemment de manière à recueillir des culots de mitochondries aussi purs que possible. Nous avons suivi le même protocole que pour l'étude électrophorétique de manière à obtenir toujours au moins 5 mg/ml de protéines mitochondriales.

Dans ce protocole, rappelons-le, à chaque culot de mitochondries est ajouté 1 ml d'une solution de détergent dans le tampon Véronal - Véronal sodique. Le détergent est soit le Dodécyl Sulfate, soit le Duponol, soit le Lubrol, soit le Désoxycholate, soit le Triton. La solution est agitée sur l'agitateur de Kahn puis est centrifugée. Le surnageant ainsi recueilli, dont le volume est toujours très voisin de 1 ml, nous a servi d'antigène.

Nous avons employé parallèlement un 6ème antigène constitué par un culot de mitochondries entières non traitées par les détergents.

Dans ce travail, nous n'avons utilisé qu'une seule sorte de mitochondries, celle provenant de la tumeur mammaire. Nous n'avons pas préparé d'Immun-sérums à partir des mitochondries de glandes mammaires saines, pour 2 raisons :

- La première tient au manque de souris. En effet, une

seule opération d'isolement de mitochondries de glandes mammaires saines exige l'emploi de 30 à 60 souris de la lignée C₃H. Le C.N.R.S. est arrivé bien difficilement à nous assurer la fourniture régulière des souris de cette lignée.

- La seconde vient du fait que la fraction électrophorétique surnuméraire est une fraction tumorale. Si cette fraction est bien inoculée au lapin, et si la différence antigénique avec les autres fractions protéiques mitochondriales est suffisante, la méthode de double diffusion en gélose selon OUCHTERLONY (74) doit faire apparaître un arc supplémentaire.

Le plus important, soulignons le, est d'inoculer la fraction surnuméraire pour obtenir des anticorps contre cette fraction.

Donc au total, nous avons préparé cinq séries d'extraits antigéniques que nous avons dénommées :

D D S = extrait au Dodécylsulfate

D O C = extrait au Désoxycholate

D U P = extrait au Duponol

L U B = extrait au Lubrol

T T X = extrait au Triton X 100

Le sixième antigène utilisé, une suspension d'un culot de mitochondries dans 1 ml de solution de saccharose, est équivalente à celles traitées par 1 ml de la solution de détergents puis centrifugées.

2 - Inoculation au lapin - Contrôle des Immun-sérums en cours d'immunisation par la technique d'Ouchterlony -

Les lapins que nous avons traités ont subi chacun trois injections antigéniques, chaque injection étant faite à trois semaines d'intervalles. Trois semaines après la dernière injection, les animaux ont été ponctionnés à la veine marginale de l'oreille et le sérum testé avec les antigènes.

Les animaux ont été ensuite sacrifiés et leur sang recueilli stérilement dans des tubes à centrifuger stériles.

L'inoculation a toujours été effectuée par voie intra musculaire dans la patte postérieure gauche .

Le volume injecté , 2 ml, comprenait toujours 1 ml de l'adjuvant complet de Freund, avec soit :

- le surnageant provenant du traitement par les détergents du culot de mitochondries (volume très voisin de 1 ml)
- la suspension d'un culot de mitochondries dans 1 ml de la solution de saccharose.

Après coagulation dans les tubes stériles et après rétraction du caillot, le sang recueilli a fourni un sérum qui à une exception près (I M S N° 96 L U B) a donné un sérum non hémolysé .

Le sérum de chaque lapin a été mis en ampoule de 1 ml à la pipette Pasteur stérile, et les ampoules après fermeture ont été placées au congélateur à -20° C . Au moment de l'emploi de l'ampoule, il n'y a pas de risque de pollution des autres ampoules, il n'est surtout pas nécessaire de congeler et de décongeler plusieurs fois de suite, opérations qui sont néfastes aux immunoglobulines .

Les épreuves de double diffusion en gélose, selon la technique d'Ouchterlony ont été réalisées à partir des six immun-sérums indiqués dans le tableau n° 9

a) Principe

Le principe de la technique d'Ouchterlony est très simple .

L'antigène et l'anticorps sont placés dans des petites cavités de la gélose, cavités situées l'une en face de l'autre. Antigène et

TABLEAU D'IMMUNISATION DES LAPINS
INJECTION DANS LA PATTE POSTERIEURE GAUCHE
PAR VOIE INTRAMUSCULAIRE
AVEC ADJUVANT COMPLET DE FREUND

N°	Antigène	Quantité	Adjuvant complet FREUND	1ère In- jection	2ème In- jection	3ème In- jection	Sacrifié
93	Surnageant D O C	1 ml	1 ml	15 - 07	5.08	26.08	20.09
94	Surnageant D D S	1 ml	1 ml	15.07	5.08	26.08	20.09
95	Surnageant D U P	1 ml	1 ml	15.07	5.08	26.08	20.09
96	Surnageant L U B	1 ml	1 ml	15.07	5.08	26.08	20.09
97	Surnageant T T X	1 ml	1 ml	15.07	5.08	26.08	20.09
98	Mitochondries	1 ml	1 ml	15.07	5.08	26.08	20.09

Tableau n°9

Anticorps diffusent au sein de la gélose autour du point de dépôt. Il y a donc bien double diffusion. Il se crée un gradient de concentration. Lorsque le rapport des concentrations relatives de l'antigène et de l'anticorps est optimal, la précipitation apparaît sous forme d'une ligne ou d'une zone continue au sein du gel. Puisque les systèmes précipitent selon un rapport de concentration Antigène Anticorps caractéristique de chacun d'eux, toutes les zones de précipitation distinctes sont dues à des systèmes immunologiques différents. Il est également possible de déceler un antigène commun à deux extraits pour un même immun-sérum. Dans ce cas, si les deux cavités sont placées côte à côte, les arcs de précipitation se rejoignent et ne forment qu'une seule ligne continue. Si les deux antigènes sont différents les arcs se coupent.

b) Essais préliminaires (Schéma n° I7)

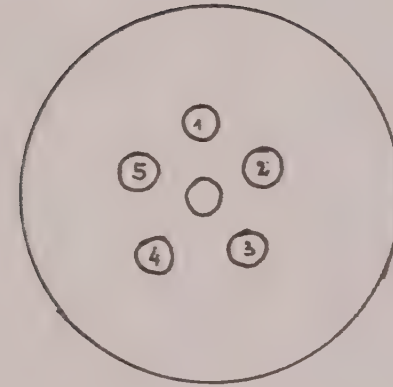
Leur objectif est d'éviter les phénomènes de zone. Nous avons d'abord essayé chaque immun-sérum dilué de 2 en 2 avec l'antigène lui correspondant selon le schéma suivant :

Au centre, l'antigène non dilué, représenté par le surnageant après traitement par le détergent renferme au moins 5 mg/ml de protéines.

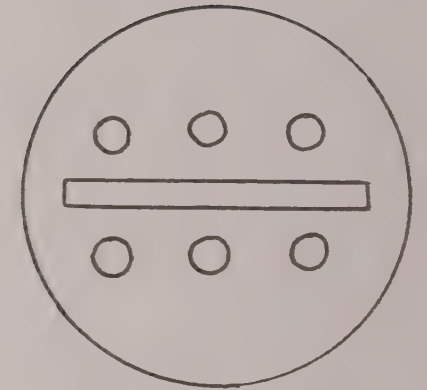
Autour de l'antigène , l'immun-sérum dilué de 2 en 2 :

dans la cavité n° 1		l'immun-sérum utilisé pur
dans la cavité n° 2	"	dilué au 1/2
dans la cavité n° 3	"	dilué au 1/4
dans la cavité n° 4	"	dilué au 1/8
dans la cavité n° 5	"	dilué au 1/16

Nous avons retenu pour chaque immun sérum, la dilution qui nous permettait d'obtenir le plus grand nombre d'arcs de précipitation. La meilleure dilution pour nos immun-sérums a toujours été la dilution au 1/2, qui décelait entre 1 et 3 arcs de précipitation au cours des différents essais.



Essais préliminaires



Essais définitifs

SCHEMA N° 17

c) Technique définitive (Schéma n° I7)

La préparation du gel de gélose selon OUCHTERLONY (74) a été légèrement modifiée. Nos extraits antigéniques diffusant mal au sein de la gélose, nous avons été amené à abaisser la concentration du gel de 15 g/litre à 10 g/litre.

Un gramme de gélose DIFCO est placé dans un récipient renfermant 100 ml de sérum physiologique à 9 g/litre et à 1 ml d'une solution à 1 pour 1000 d'acide mercurothiolique*.

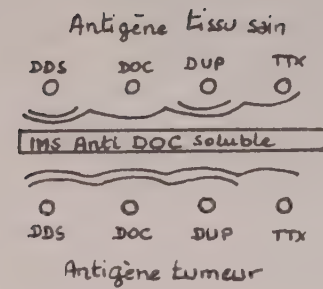
Après dissolution à l'ébullition, le récipient est mis à refroidir, à la température du laboratoire, jusqu'à 45° -50° C. Lorsque cette température est atteinte, la gélose encore liquide est répartie dans des boîtes de pétri en plastique de 50 mm de diamètre, à fond parfaitement plat, à raison de 5 ml par boîte. La solidification s'effectue dans les quelques minutes qui suivent et les boîtes sont laissées ainsi jusqu'au lendemain. Le lendemain, les différentes cavités sont découpées à l'emporte-pièce. Les cavités circulaires sont destinées à recevoir les antigènes, leur capacité est d'environ 50 micro-litres. La cavité centrale est destinée à recevoir l'immun-sérum. Sa capacité est d'environ 500 microlitres. Antigènes et immun-sérum sont placés dans leur cavité respective et les boîtes sont laissées à la température du laboratoire pendant au moins 36 heures avant la lecture définitive.

II - Les résultats obtenus

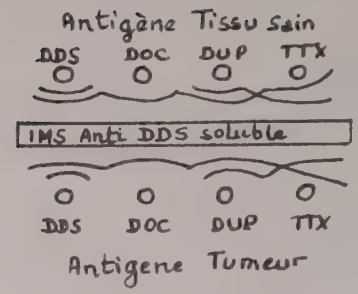
L'ordre chronologique des essais a été le suivant :

- 1) Essai global, sur une seule boîte, des divers antigènes provenant de la tumeur et des glandes mammaires avec les immun-sérums différents - Tableau des résultats du premier groupe
(schéma n° I8)

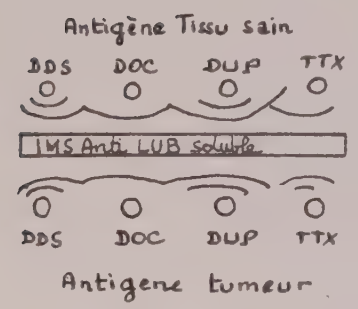
Avec l'immun-sérum anti mitochondries (n° 4) , aucune



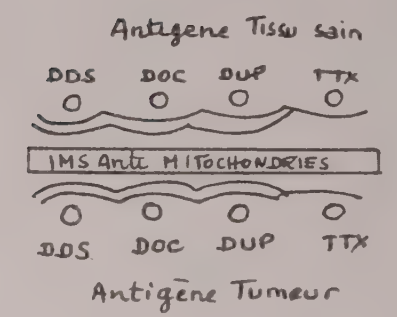
n° 1



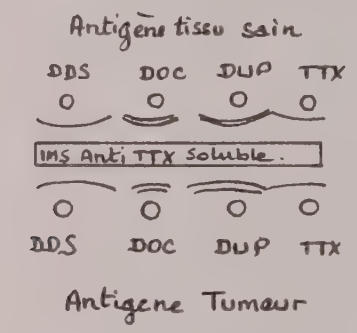
n° 2



n° 3



n° 4



n° 5

SCHEMA N° 18

Première série des essais immunologiques
Premier groupe de résultats.

différence n'est décelable entre les antigènes extraits de la tumeur et ceux extraits des glandes mammaires saines. Il y a 2 arcs de précipitation avec tous les détergents, sauf avec le Triton X 100, qui ne donne qu'un seul arc. Les arcs sont continus, ce qui révèle une parenté antigénique.

Avec l'immun-sérum anti D O C soluble (n° 1), il semble manquer un antigène dans l'extrait antigénique obtenu après traitement des glandes mammaires par le désoxycholate. La plupart des arcs sont continus, ce qui indique là encore une parenté antigénique.

Avec l'immun-sérum anti D D S soluble (n°2) l'aspect est sensiblement différent sur plusieurs points :

- On ne retrouve qu'un seul arc avec l'antigène D O C soluble dans le cas de la tumeur et dans le cas des glandes mammaires saines.
- Les antigènes extraits par le Triton donnent lieu à trois observations :
 - Il y a deux arcs de précipitation ;
 - la diffusion de l'antigène a été différente et le schéma montre qu'elle est inversée. Il existe cependant une parenté antigénique, car les arcs inversés se rejoignent.
 - Il n'y a qu'un seul arc de précipitation avec l'antigène extrait par le Désoxycholate, qu'il s'agisse de la tumeur ou des glandes mammaires saines.

Avec l'immun-sérum L U B soluble , l'aspect est très voisin du précédent avec cependant une différence concernant les Antigènes extraits par le Triton. Les arcs sont peu visibles et ne présentent pas d'inversion, car ils ne se recoupent pas.

Avec l'immun-sérum T T X soluble, les arcs sont très peu visibles
Ils présentent un aspect identique à celui obtenu avec l'immun-sérum
anti mitochondries .

- 2) Essai de groupement d'un même côté de la gouttière centrale de
l'extrait antigénique, provenant d'une part de la tumeur et d'autre
part des glandes mammaires en vue d'une identification d'antigènes
communs dans les deux tissus .

(deuxième groupe des résultats immunologiques)(Schéma n° 19)

Avec l'immun-sérum anti D O C soluble ;

il y a :

- deux arcs continus, pour tumeur et glandes mammaires saines
avec les extraits antigéniques obtenus avec le Duponol et le
Dodécylsulfate.
- deux arcs de précipitation pour l'extrait tumoral au Désoxy-
cholate et un seul arc pour l'extrait du tissu sain au désoxy-
cholate .
- un arc de précipitation pour l'extrait tumoral au Triton X 100
et pas d'arc pour l'extrait du tissu sain au Triton X 100.

Avec l'immun-sérum anti D D S soluble ;

on observe :

- Trois arcs de précipitation continus donc trois antigènes
communs au tissu sain et au tissu tumoral, avec l'extrait anti-
génique au Duponol .
- deux arcs continus, donc deux antigènes communs aux deux
types de tissu , avec l'extrait antigénique au Dodécylsulfate.

- Pour les extraits au désoxycholate une différence analogue à celle remarquée avec l'immun-sérum anti D O C soluble, à savoir :
 - deux antigènes pour le tissu tumoral, un seul antigène pour le tissu sain
- Pour les extraits au Triton X 100, deux arcs dont un continu indiquant une communauté antigénique .

- Avec l'immun-sérum anti Lubrol soluble :

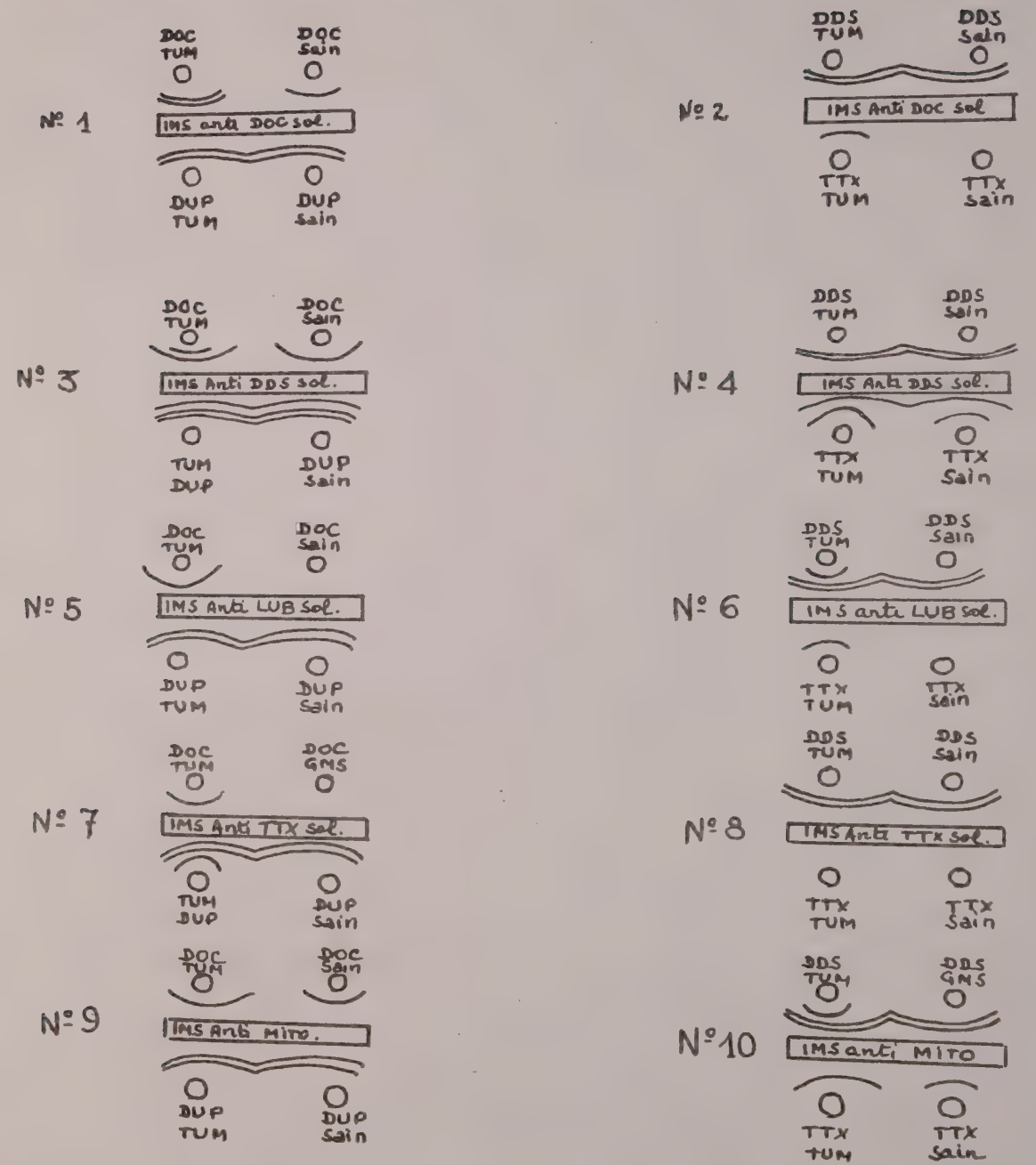
Il se produit :

- un seul arc de précipitation avec l'extrait antigénique tumoral au Désoxycholate. Rien avec l'extrait antigénique du tissu sain correspondant .
- deux arcs de précipitation continus, donc deux antigènes communs aux deux tissus après extraction des antigènes par le Duponol.
- trois arcs de précipitation avec l'extrait antigénique tumoral au Dodécyl sulfate ; deux arcs seulement, mais communs aux deux tissus, avec l'extrait antigénique du tissu sain.
- un seul arc de précipitation révélé par l'extrait antigénique au Triton de la tumeur. Rien avec l'extrait antigénique du tissu sain correspondant .

- Avec l'immun-sérum anti Triton soluble

On fait les constatations suivantes :

- Aucune précipitation avec les extraits antigéniques préparés avec le Triton.
- Un seul arc de précipitation avec l'extrait tumoral antigénique au Désoxycholate. Rien avec l'extrait antigénique provenant du tissu sain.
- le même aspect que précédemment pour les extraits antigéniques



SCHEMA N° 19

Première série des essais immunologiques
Deuxième groupe de résultats

au Dodécyl Sulfate.

- Les extraits obtenus avec le Duponol où le Dodécyl Sulfate donnent les mêmes arcs de précipitation.

- Avec l'immun-sérum anti mitochondries

Il y a :

- un seul arc de précipitation paraissant commun aux deux tissus après extraction avec le Désoxycholate.
- deux arcs de précipitation communs aux deux tissus après extraction par le Duponol.
- trois arcs de précipitation avec l'extrait tumoral au Dodécyl Sulfate contre deux à l'extrait antigénique de tissu sain ; ces deux arcs étant communs à ceux provenant du tissu tumoral .

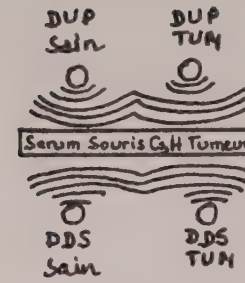
3) Essais effectués pour retrouver, dans le sérum des souris porteuses de tumeur , des anticorps anti mitochondries.

Nous avons recherché dans le sérum des souris porteuses de la tumeur, les anticorps anti-mitochondries. Dans ce but, nous avons prélevé par ponction cardiaque sur plusieurs souris quelques millilitres de sang au moment de la **transplantation**. Le sérum a été recueilli après centrifugation, et essayé contre les antigènes de mitochondries provenant de la tumeur et des glandes mammaires saines.

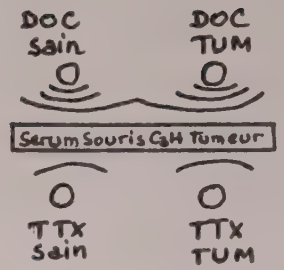
Les constatations faites figurent dans le troisième groupe de résultats immunologiques du schéma n° 20.

Il est frappant de relever le grand nombre d'arcs obtenu tant avec les extraits antigéniques de la tumeur qu'avec les extraits antigéniques des tissus sains, à l'exception toutefois des extraits au Triton.

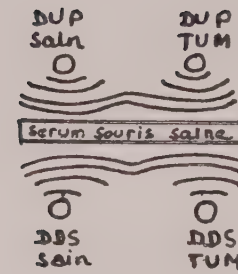
Ces derniers ne présentent , en effet, qu'un seul arc de précipitation.



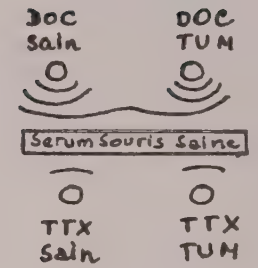
N° 1



N° 2



N° 3



N° 4

SCHEMA N° 20

Première série des essais immunologiques
Troisième groupe des résultats.

Ces résultats nous ont conduit à effectuer le même essai, avec du sérum de souris de la lignée C_{3H} , saines, exemptes de tumeur .

Les conclusions de cette essai furent en tous points identiques. Nous avons alors immédiatement songé à une précipitation des immun-sérums sous l'action des différents détergents, et nous avons ainsi été amené au 4ème groupe d'essais .

4) Essai comparatif de l'action des détergents seuls et des extraits antigéniques tumoraux obtenus avec ces mêmes détergents (4ème groupe de résultats immunologiques) . Schéma n° 21

Nous avons utilisé pour cet essai nos immun-sérums de lapin et dans un 6ème essai un sérum de veau.

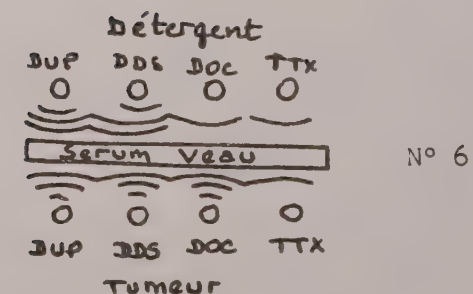
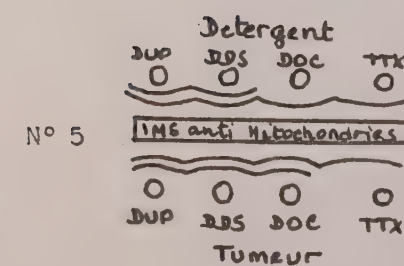
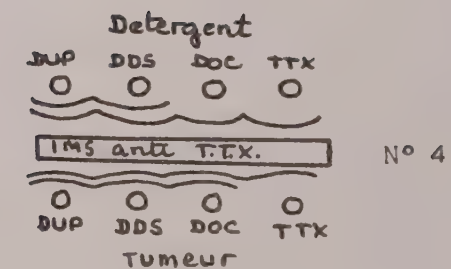
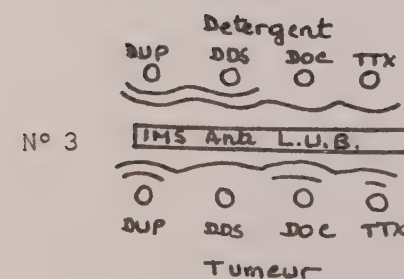
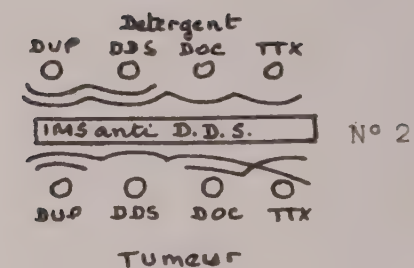
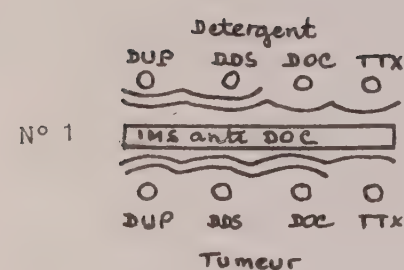
Les résultats sont assez nets :

- Les détergents seuls donnent en moyenne autant d'arcs de précipitation que les extraits antigéniques mitochondriaux à une exception près, le Désoxycholate de sodium .
- On aurait pu penser que le sérum de veau utilisé comme un sérum aspécifique ne donne aucun arc de précipitation . Or, il s'avère que le nombre d'arcs est là encore aussi important, sinon plus, qu'avec les sérums de lapins .

III - Discussion des Résultats -

Nous venons d'exposer les résultats atteints dans l'ordre chronologique. Chaque étape nous a conduit à la suivante jusqu'à la dernière. Celle-ci concerne les "témoins de réaction " elle aurait dû logiquement être réalisée la première .

Nous n'avons relevé, en effet, la présence de témoins de précipitation dans aucune des publications traitant de l'utilisation des détergents pour l'étude immunologique des mitochondries .



SCHEMA N° 21

Première série des essais immunologiques
Quatrième groupe de résultats.

Notre idée initiale était de déceler dans les mitochondries tumorales un antigène différent de ceux existant dans les mitochondries normales. Il était donc logique d'effectuer, dès le début, les deux premiers groupes d'essais. Après avoir noté que les résultats obtenus étaient un peu "anarchiques" nous avons pensé pouvoir mieux cerner le problème en recherchant des anticorps antimitochondries dans le sérum des souris ayant reçu la greffe de la tumeur. C'est à ce stade que nous avons décelé une faille dans notre protocole opératoire. En effet, le sérum de souris porteuse de tumeur (3 semaines après l'inoculation) donnait un nombre d'arcs supérieur et de beaucoup à celui obtenu avec les immun-sérums de lapin. Plusieurs explications pouvaient être données :

- les lapins sont de mauvais fournisseurs d'anticorps antimitochondries.

ou bien,

- les lapins n'avaient pas été immunisés suffisamment.

ou encore ,

- les souris portaient un très grand nombre d'anticorps antimitochondries,

ou enfin,

- il s'agissait d'une précipitation non spécifique du sérum de souris.

L'examen détaillé de ces quatre hypothèses montre rapidement qu'une seule doit être valable.

Il est possible, en effet, que les lapins soient de mauvais producteurs d'anticorps antimitochondries, mais nous savons que les auteurs (2), dont nous avons suivi le protocole, ont cependant abouti à des conclusions immunologiques intéressantes .

Il est possible que les lapins n'aient pas été suffisamment immunisés, malgré l'application d'un protocole opératoire similaire à celui des auteurs déjà cités.

Il fallait donc pour déterminer la part des deux dernières explications possibles, effectuer une réaction de précipitation avec du sérum de souris C₃H non porteuses de tumeur. Les résultats de cette série d'essais ont

permis de constater que la précipitation était "aspécifique" et que le nombre d'arcs obtenus était le même qu'avec le sérum "tumoral".

Mais là encore, deux explications étaient possibles :

Il pouvait s'agir soit de l'action précipitante des détergents utilisés vis à vis d'un sérum contenant un taux de protéines tel, que la rencontre détergent protéine aboutisse à une précipitation, soit d'anticorps antidétergents, les détergents liés aux fractions protéiques des mitochondries, pouvant éventuellement jouer le rôle d'haptène .

Pour élucider ce problème, nous avons réalisé le quatrième groupe d'essais qui se révéla très efficace. Il nous permit, en effet, de trouver sensiblement le même nombre d'arcs de précipitation pour les détergents utilisés seuls et les extraits antigéniques tumoraux, il nous permit aussi de constater qu'il ne s'agissait pas d'anticorps antidétergents puisque le sérum de veau donne une précipitation aspécifique .

IV - Conclusions des essais -

Bien que le résultat atteint soit négatif, et malgré l'explication que nous en avons donnée, il restait à vérifier si les lapins étaient insuffisamment immunisés :

Cette vérification exigeait encore l'exécution d'un nouvel essai.

Nous avons établi en effet, dans notre étude, que la solubilisation des mitochondries était obtenue pour une concentration donnée de détergent d'une part et de protéines mitochondriales d'autre part.

Or, dans nos essais, les détergents, même liés aux protéines existent toujours à la même concentration dans les extraits antigéniques alors qu'ils sont mis en présence d'une quantité sensiblement 10 fois supérieure de protéines, (un culot de mitochondries représentant au moins 5 mg/ml de protéines un sérum de lapin représentant au moins 50 mg/ml).

Notre dernière idée était donc de diluer 10 fois les immun-sérums et d'effectuer des réactions de précipitation analogues à celles figurant dans le premier groupe des résultats immunologiques. L'essai fut totalement négatif, aucun arc de précipitation n'est apparu sur aucune des boîtes.

Nous pouvons dégager les conclusions suivantes :

- 1 - Les lapins ayant reçu une injection par mois, pendant trois mois, de mitochondries tumorales ou de protéines extraites par les détergents n'ont pas formé un taux d'anticorps décelable en double diffusion en gélose.
- 2 - Les détergents utilisés sont capables aux concentrations employées de donner des résultats "aspécifiques" en présentant des arcs de précipitation dont le nombre est différent suivant que l'on s'adresse à du sérum de lapin, de souris ou de veau .
- 3 - Les détergents donnant le plus grand nombre de précipités aspécifiques sont pas ordre décroissant le Duponol , le Dodécysulfate, le Désoxycholate et le Triton X 100 .
- 4 - Le contrôle de la production d'anticorps, au cours de l'immunisation, doit se faire en prenant la précaution indispensable de faire diffuser en même temps que l'antigène, le détergent utilisé seul comme témoin .
- 5 - Il ne semble pas que les détergents jouent un rôle d'haptène, la vérification devra être faite dans les essais à venir .
- 6 - Pour résoudre le problème immunologique par l'utilisation des détergents comme moyen de solubilisation des protéines mitochondriales, il faut, ou bien faire appel à une nouvelle immunisation plus prolongée et faire des témoins de diffusion, ou bien mettre en oeuvre des techniques de solubilisation des protéines mitochondriales et des techniques de révélation différentes .

Parmi les techniques de solubilisation dont nous avons parlé au début de ce travail (2ème partie, chapitre I), nous ne pouvons guère retenir que celles utilisant les détergents. En effet, la rupture mécanique ou

la rupture par les ultra-sons fait éclater les mitochondries mais ne libère pas pour autant les protéines dans le milieu. Celles-ci restent plus ou moins collées aux crêtes et aux membranes et lors des essais, la diffusion ne se fait pas ou se fait dans de mauvaises conditions ; de plus, une centrifugation des mitochondries rompues par un moyen mécanique ne laisse dans le surnageant que très peu de protéines solubles.

Les autres techniques emploient des agents tensio-actifs analogues à ceux que nous avons utilisés ou de la Saponine.

En ce qui concerne la révélation de l'action Antigène Anticorps , notre problème est plus limité car l'emploi d'hématies pour une déviation du complément, une hémagglutination ou une inhibition d'hémagglutination se heurte à la lyse de celles-ci par les agents tensio-actifs. Comme une réaction de neutralisation ne pouvait être envisagée, un support à la réaction faisant défaut, il ne reste que la réaction de précipitation en gélose ou en milieu liquide.

Une solution comportant la destruction des détergents au moyen d'agents chimiques comme l'acétone qui décompose le Dodécylsulfate et le fait précipiter, ne peut être adoptée pour les raisons suivantes :

- 1 - Si l'on sait détruire le Dodécylsulfate au moyen de l'acétone, les autres produits comme le Duponol, le Lubrol ou le Triton ne sont pas ou mal connus et on ne sait pas comment s'en débarrasser .
- 2 - L'action de l'acétone sur les protéines est une action dénaturante et dans les réactions immunologiques il vaut mieux éviter la dénaturation des protéines, déjà modifiées par les détergents.
- 3 - On ignore enfin, dans quelle mesure les complexes protéine détergent solubilisés ne seraient pas reprécipités au même titre que les détergents seuls par un solvant comme l'acétone qui par ailleurs est un mauvais solvant des protéines. D'autre part, si l'on admet que les complexes ne soient pas précipités, dans quelle mesure ne s'adsorbent-ils pas sur le précipité des

détergents et ne seraient-ils pas entraînés ensuite par la centrifugation?

Pour toutes ces raisons, nous avons préféré nous en tenir aux techniques déjà décrites, en prenant soin d'observer les précautions que nous avons déjà citées .

C - DEUXIEME SERIE D'ESSAIS IMMUNOLOGIQUES

I - Matériel et méthodes -

1 - Les antigènes utilisés pour la production d'anticorps

Les difficultés que nous avons rencontrées lors de la première série des essais immunologiques, nous ont conduit à limiter volontairement le nombre de lapins mis en expérience. Nous avons choisi en guise d'antigènes :

- les mitochondries tumorales isolées ;
- l'extrait soluble obtenu après action du désoxycholate puis centrifugation .
- l'extrait insoluble après action du Désoxycholate et remise en suspension dans 1 ml d'eau stérile .
- l'extrait soluble après action du Dodécylsulfate puis centrifugation.

Nous avons employé l'extrait antigénique au Dodécylsulfate car ce détergent nous a permis de noter une différence dans le comportement électrophorétique des protéines mitochondriales de la tumeur d'une part et du tissu sain d'autre part.

De plus, nous avons essayé d'utiliser la fraction mitochondriale insoluble dans le Désoxycholate car HOKO (44) a décelé la présence d'un antigène spécifique de cancer dans la fraction désoxycholate insoluble des mitochondries de cellules cancéreuses.

Enfin, la comparaison d'un immun-sérum antimitochondries et des immun-sérums antiprotéines extraites par le Désoxycholate et par le Dodécylsulfate devrait apporter les renseignements utiles sur le contenu protéique et antigénique des mitochondries .

2 - Protocole d'innoculation au lapin - Essais préliminaires

Nous avons fait appel dans cette deuxième série d'essais immunologiques à une technique voisine de celle exposée par WAKABAYASHI (94) (95), modifiée

en fonction des réponses obtenues. Les injections ont été faites pendant 6 semaines à raison d'une par semaine par voie intra-musculaire dans la patte postérieure gauche (Tableau n°10) . Le volume injecté était de 2 ml à savoir : 1 ml de la suspension de mitochondries ou 1 ml de l'extrait antigénique obtenu après traitement par les détergents additionné chaque fois de 1 ml de l'adjuvant de FREUND complet . (DIFCO distributeur) .

Une semaine après la dernière injection, du sang de chaque lapin a été prélevé par ponction cardiaque et un essai préliminaire a été effectué. Les résultats n'étant pas bons, une septième injection intra-musculaire a été réalisée et des essais à nouveau effectués une semaine après l'injection. Les résultats restant décevants, nous avons eu recours à une injection de rappel par voie intra-veineuse d'une suspension de mitochondries dans le tampon saccharose - dextran . Dix jours après cette injection de rappel à tous les lapins, un essai a été effectué après ponction cardiaque, les résultats étaient meilleurs, mais non encore satisfaisants. Nous avons donc procédé à une deuxième injection de rappel par voie intra veineuse, suivie 12 jours après, d'une ponction cardiaque. Les résultats s'avérèrent insuffisants.

Au cours de cette période d'immunisation, les lapins reçurent donc sept injections intra musculaires avec de l'adjuvant complet de Freund, suivies de deux injections intra veineuses dans la veine marginale d'une suspension de mitochondries dans le tampon Saccharose-dextran. (1 culot de mitochondries renfermant au moins 5 mg/ml de protéines dans 5 ml du tampon). Les lapins subirent aussi quatre ponctions cardiaques.

3 - Méthodes immunologiques

Les méthodes ont été les mêmes que pour le premier groupe d'essais à savoir :

- technique de double diffusion en gélose selon Ouchterlony avec emploi systématique d'un témoin de détergent pour éliminer toute précipitation aspécifique due à la différence de concentration protéine détergent .

	Injection Intra musculaire pendant 6 semaines à raison d'une injection par semaine + Adjuvant complet de Freund.	8 jours après la dernière injection	3 jours après l'essai injection intra musculaire avec adjuvant complet de Freund	8 jours après la dernière injection	3 jours après l'essai 1er Rappel	10 jours après le premier rappel	3 jours après l'essai 2ème Rappel	10 jours après le 2ème rappel	12 jours après les Essais
LAPIN N° 1	6 Injections MITOCHONDRIES	Ponction Essai	1 Injection MITOCHONDRIES	Ponction Essai	Injection Intra veineuse MITOCHONDRIES	Ponction Essai	Injection Intra veineuse MITOCHONDRIES	Ponction Essai	Animal Sacrifié
LAPIN N° 2	6 injections D.O.C.soluble	Ponction Essai	1 Injection D.O.C.soluble	Ponction Essai	Injection Intra veineuse MITOCHONDRIES	Ponction Essai	Injection Intra veineuse MITOCHONDRIES	Ponction Essai	"
LAPIN N° 3	6 Injections D.O.C. insoluble	Ponction Essai	1 Injection D.O.C. insoluble	Ponction Essai	Injection Intra veineuse MITOCHONDRIES	Ponction Essai	Injection Intra veineuse MITOCHONDRIES	Ponction Essai	Animal mort 8 jours après
LAPIN N° 4	6 Injections D.D.S.soluble	Ponction Essai	1 Injection D.D.S.soluble	Ponction Essai	Injection Intra veineuse MITOCHONDRIES	Ponction Essai	Injection Intra veineuse MITOCHONDRIES	Ponction Essai	"

TABLEAU D'IMMUNISATION DES LAPINS

2ème SERIE D'ESSAIS

IMMUNOLOGIQUES

Tableau n° 10

II - Résultats et première discussion

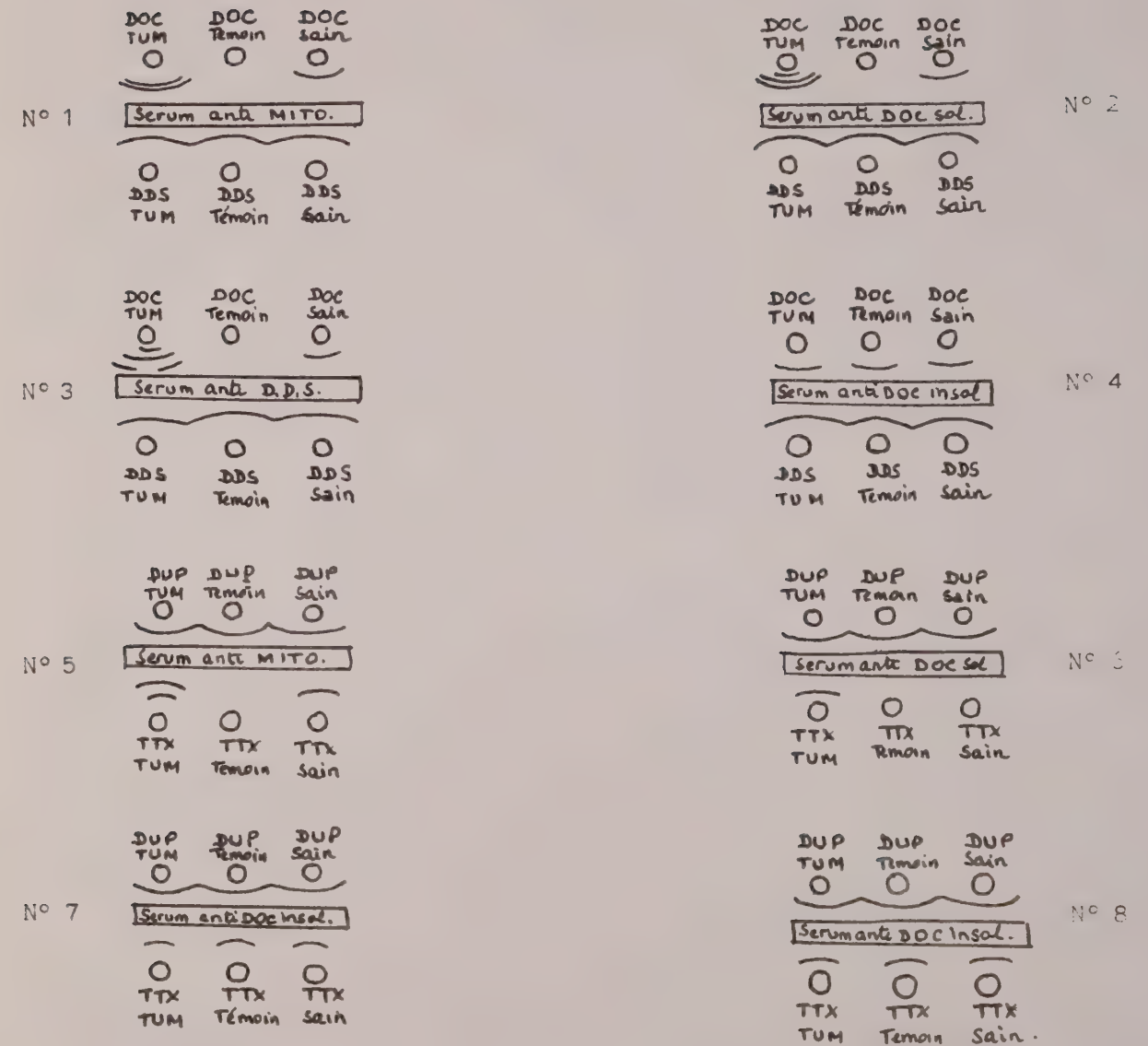
1 - Premier groupe de résultats immunologiques - Schéma n°22

a) Les Résultats

L'immun-sérum est placé dans la rigole centrale et les antigènes de part et d'autre, le témoin de détergent étant situé entre l'antigène du tissu tumoral et l'antigène du tissu sain.

Les résultats de ce premier groupe d'essais sont beaucoup moins "anarchiques" que ceux donnés par les essais précédents. Les points les plus remarquables sont les suivants :

- Au plan général, on peut séparer les résultats en deux groupes car ils sont similaires avec d'une part le Désoxycholate et le Triton, et d'autre part avec le Duponol et le Dodécylsulfate quel que soit l'immun-sérum utilisé.
- Au plan particulier, on peut noter ce qui suit :
 - 1°) - le Duponol ou le Dodécylsulfate ne donne qu'un seul arc de précipitation continu avec les antigènes et le témoin, quel que soit l'immun-sérum et bien que l'on retrouve trois arcs de précipitation avec l'immun-sérum anti Dodécylsulfate lorsqu'il est en présence de l'antigène du tissu tumoral extrait par le Désoxycholate.
 - 2°) on obtient avec le Désoxycholate ou le Triton , aucun arc de précipitation avec les témoins , deux arcs de précipitation avec l'antigène mitochondrial provenant de la tumeur et un seul arc de précipitation avec l'antigène provenant du tissu sain, en prenant l'immun-sérum anti mitochondries .



SCHEMA N° 22

Deuxième série des essais immunologiques
Premier groupe de résultats.

3°) - Avec l'immun-sérum anti Désoxycholate soluble, on retrouve le même nombre d'arcs de précipitation avec les antigènes extraits par le Désoxycholate mais un seul arc avec l'Antigène extrait de la tumeur par le Triton. Il n'y a plus d'arc avec l'Antigène extrait du tissu sain avec le même détergent .

4°) Si l'on prend l'immun-sérum anti Dodécylsulfate on obtient toujours le même nombre d'arcs pour les antigènes extraits par le Désoxycholate, mais aucun arc en utilisant le Triton.

5°) Enfin, avec le sérum anti désoxycholate insoluble, les résultats sont similaires avec les antigènes extraits par le Désoxycholate ou le Triton, et on obtient une ligne continue mais de faible intensité même au niveau du témoin d'antigène .

b) La Signification

De ces essais, on peut tirer les conclusions suivantes :

-Les immun-sérums anti mitochondries, anti désoxycholate soluble, et anti dodécylsulfate renferment des anticorps.

-L'immun-sérum anti Désoxycholate insoluble ne renferme pas d'anticorps contre les antigènes utilisés car on retrouve chaque fois une ligne continue de précipitation même avec le témoin antigène.

-Les anticorps formés chez le lapin révèlent la présence d'au moins 2 anticorps différents dans la tumeur et d'un seul dans le tissu sain lorsqu'on les extrait au moyen du désoxycnolate ou au moyen du Triton .

-Par contre on n'observe aucune trace d'anticorps dans le sérum anti dodedécylsulfate lorsqu'on veut le révéler au moyen de l'antigène homologue ou au moyen de l'antigène extrait par le Duponol. Cependant il y a des anticorps dans ce sérum puisqu'on obtient

deux arcs de précipitation avec l'antigène tumoral extrait par le Désoxycholate et un arc de précipitation avec l'antigène extrait du tissu sain .

On peut donc penser que les anticorps n'ont pas pu être révélés , par suite de la précipitation aspécifique due au détergent et que cette précipitation , par encombrement stérique empêche la diffusion d'autres fractions protéiques ou encore a fait précipiter en même temps la fraction renfermant les anticorps .

-De toutes façons, la technique immunologique nous a révélé une différence antigénique notable entre le contenu protéique des mitochondries venant de la tumeur et le contenu protéique provenant des glandes mammaires saines .

2- Deuxième groupe de résultats immunologiques

a) Les Résultats -

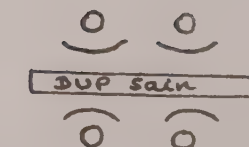
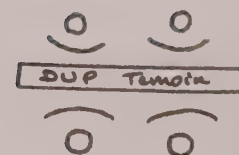
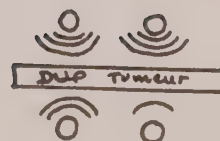
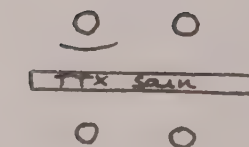
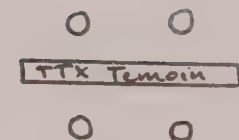
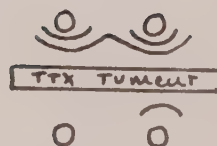
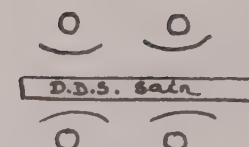
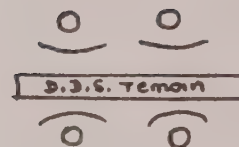
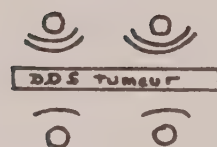
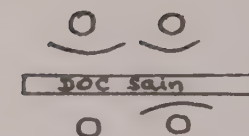
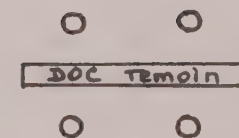
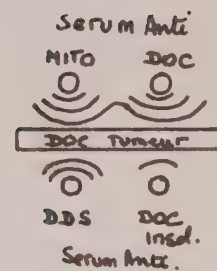
Pour mieux cerner le problème de l'empêchement stérique lors de la précipitation aspécifique, nous avons essayé d'inverser les sens de diffusion de manière à inverser les concentrations en détergents et en immun-sérums. Nous avons donc placé les antigènes dans la rigole centrale et les immun-sérums de part et d'autre de celle-ci. Nous avons alors fait trois séries d'essais :

- la première avec les antigènes provenant de la tumeur
- la seconde avec les témoins de détergents
- la troisième avec les antigènes provenant du tissu sain.

Les résultats figurent sur le schéma n°23

Ces résultats correspondent, à quelques différences près aux observations faites précédemment.

Ces différences portent sur la présence de 2 arcs de précipitation entre l'immun-sérum anti dodécylsulfate et l'antigène tumoral extrait par le Duponol. On retrouve d'autre part 2 arcs entre ce même immun-sérum et l'antigène tumoral extrait par le Désoxycholate, ce qui prouve que cet immun-sérum renferme des anticorps. Il n'a cependant pas été possible de faire réagir cet immun-sérum avec



SCHEMA N° 23

Deuxième série des essais immunologiques
Deuxième groupe des résultats.

l'antigène homologue pour obtenir des arcs de précipitation révélant autre chose qu'une précipitation aspécifique .

b) Discussion et signification de ces résultats -

Ce deuxième groupe d'essais n'apporte pas d'éléments nouveaux. On retrouve sensiblement les mêmes résultats que précédemment à une exception près.

Cette exception permet de confirmer que l'immun-sérum anti Dodécylsulfate renferme bien les Anticorps non détectables avec la technique utilisée à cause de la barrière de précipitation aspécifique .

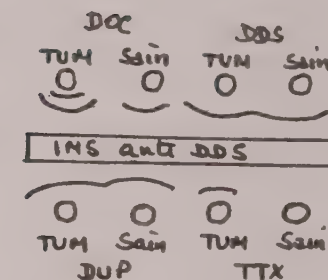
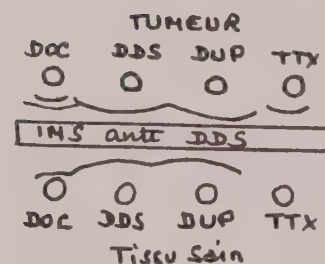
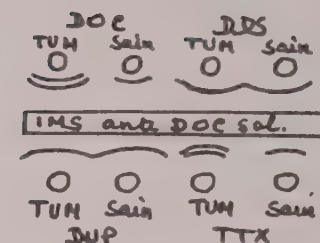
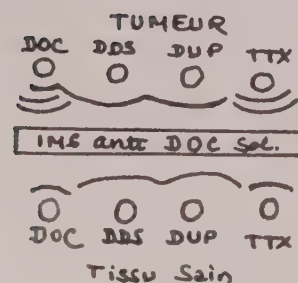
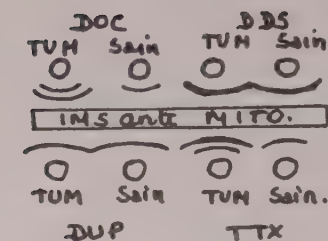
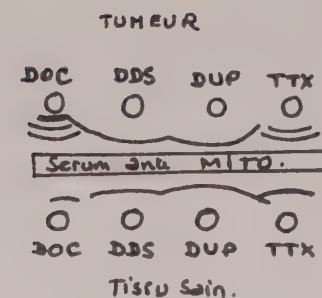
3 - Troisième groupe d'essais immunologiques -

Pour compléter notre étude nous avons réuni autour d'un même immun-sérum tous les antigènes, en faisant varier leur disposition (2 séries) et sans placer de témoins d'antigènes puisque grâce aux expériences précédentes, nous connaissons leur rôle d'agent précipitant .

Les résultats sont regroupés dans le 3ème groupe des essais.

Dans les figures situées à gauche sur le schéma n°24 nous avons placé de part et d'autre de la rigole les extraits antigéniques de la tumeur et les extraits antigéniques des glandes mammaires et dans les figures situées à droite sur le schéma n° 24 , nous avons placé côte à côte les extraits antigéniques de la tumeur et du tissu sain.

Les nouveaux résultats recoupent les précédents déjà décrits. Dans ces derniers essais, nous n'avons pas utilisé l'immun-sérum Désoxycholate insoluble qui d'après nos expériences ne donne aucun renseignement supplémentaire.



SERIE I

SERIE II

SCHEMA N° 24

Deuxième série des essais immunologiques
Troisième groupe de résultats.

III - Discussion des Résultats

1) Avant-Propos

Avant de commencer toute discussion relative à des travaux immunologiques traitant du contenu antigénique des mitochondries, il nous paraît opportun de résumer de manière précise les conclusions auxquelles aboutissent notre étude immunologique .

- En premier lieu, nous avons réussi à obtenir chez le lapin, des anticorps anti-mitochondries et des anticorps contre les fractions mitochondriales solubles dans le désoxycholate et le dodécylsulfate.

- En second lieu, il s'avère qu'il existe un antigène supplémentaire dans les mitochondries de la tumeur qui n'existe pas dans celles provenant du tissu sain .

-En troisième lieu, il faut bien dire que la différence obtenue par électrophorèse des protéines était visible avec le dodécylsulfate , et ne l'était pas avec le désoxycholate. Mais comme l'immun-sérum anti Dodécylsulfate donne avec le désoxycholate les mêmes arcs de précipitation que les immun-sérums antimitochondries ou anti désoxycholate, on retrouve donc bien là encore une différence qui d'électrophorétique devient immunologique, malgré les précipitations aspécifiques des détergents comme le Duponol ou le Dodécylsulfate.

-Enfin , il faut rappeler que toute étude immunologique du contenu protéique mitochondrial utilisant les détergents comme agents de solubilisation des protéines doit nécessairement comprendre des témoins de diffusion des détergents seul à la concentration utilisée pour solubiliser les protéines mitochondriales.

2) Le Problème immunologique posé par les mitochondries

a) Travaux généraux concernant l'immunologie des mitochondries

A partir du moment où il est devenu possible d'étudier comparativement grâce à l'ultracentrifugation les fractions subcellulaires des tissus normaux et tumoraux, de nombreux auteurs comme RAPPORT (81), HORN (47) (48) (49), TAKEDA (88), ZILBER (101) KIKUCHI (54), HOKO (44) et d'autres ont porté leurs efforts de recherches immunologiques sur l'existence possible d'un antigène spécifique de cancer dans les mitochondries des cellules cancéreuses. HORN, notamment, a pu montrer que la fraction antigénique la plus forte des cellules d'ascite d'ERLICH peut être détectée dans les mitochondries et dans la fraction nucléaire. RAPPORT et GRAF (81) indiquent l'existence possible d'antigènes spécifiques de cancer dans les mitochondries du lymphosarcome de rat. TAKEDA (88) a pu montrer que les rats immunisés avec la fraction mitochondriale de l'hépatome DAB, finissent par acquérir une forte résistance à la transplantation de cet hépatome. KIKUCHI (54) a rapporté des résultats similaires. ZILBER (101) a pu noter la présence d'un antigène spécifique de cancer dans l'hépatome induit chez le rat par des substances cancérogènes chimiques. HOKO a signalé la présence d'un antigène spécifique de cancer dans la fraction désoxycholate insoluble de cellules de l'hépatome du rat. Ces expériences sont pratiquement toujours eu des bases immunologiques "in vivo" et non "in vitro" et elles suggèrent donc l'existence d'un antigène spécifique de cancer. Mais il existe d'autres auteurs qui ont une opinion inverse. Ils pensent que la cancérisation fait disparaître au niveau cellulaire un antigène présent dans la cellule normale.

C'est ainsi qu'HOGEBOM et ses collaborateurs (42) ont établi dans leur étude des protéines de mitochondries de foie de rat, qu'une partie de celles-ci présentes dans le tissu normal disparaissent lors de la cancérisation.

WEILER (96) a pu faire les mêmes constatations et confirmer les travaux précédents. KAYE (52) a rapporté des différences antigéniques existant entre l'épithélium urinaire sain et tumoral. NAINR (71) et ses collaborateurs ont observé la perte de l'antigénicité spécifique des organes du tractus gastro

intestinal au cours des néoplasmes. BARCH (6) a montré que l'adénocarcinome rénal de ~~lacké~~ de la grenouille *Rana Pipiens* renferme un antigène de moins que le tissu sain rénal .

De ces constatations en apparence contradiction, que peut-on tirer ?

Il est certain que les études publiées par ces auteurs sont justifiées, elles ont d'ailleurs été plus ou moins confirmées par d'autres. La notion d'antigène mitochondrial reste cependant fondamentale dans le développement de notre sujet.

Or, si les premiers auteurs cités parlent tous d'antigène mitochondrial supplémentaire dans la tumeur , le deuxième groupe d'auteurs signalent une simplification des antigènes cellulaires .

Seul, HOGEBOM trouve une simplification au niveau mitochondrial .

Enfin, les derniers travaux, notamment ceux de TA KAYANAKI (87) et de WAKABAYASKI (94) (95), effectués sur de nombreuses souches d'hépatomes du rat ont permis de conclure que dans tous les hépatomes étudiés, il existe un antigène spécifique de cancer dans les protéines de mitochondries de la tumeur et que cet antigène n'existe pas dans le tissu sain.

Il semble donc certain d'après ces travaux, qu'il existe bien au niveau des mitochondries des tumeurs étudiées un antigène supplémentaire qui, d'après leurs auteurs , est spécifique du cancer.

b) que peut-on penser du tissu tumoral mammaire de la souris C_3H ?

Sur ce point bien précis de l'antigénicité des mitochondries de la tumeur d'une part et du tissu sain homologue d'autre part, les publications font défaut, alors que le virus de la tumeur mammaire (V.T.M.) fait l'objet d'études de plus en plus approfondies ainsi qu'en témoignent les 490 références de l'article de BLAIR (13). Les seules publications ayant un rapport avec notre travail sont celles de MINTON (67), de KRUGER (57) et de PONTIERI (78) et dans une certaine mesure, celles de GRAFFI (35).

1) Les travaux de MINTON sont, à notre avis, importants. MINTON a recherché in vivo le pouvoir antigénique relatif des fractions subcellulaires en injectant avant la greffe d'une tumeur mammaire spontanée de la souris C_3H , les différentes fractions subcellulaires de la tumeur, et de différents tissus sains (poumons, coeur, foie, rate, muscle, et ganglions lymphatiques). Parmi les extraits antigéniques injectés, il y avait

- une fraction mitochondriale venant de la tumeur
- une fraction mitochondriale venant des tissus sains

Chaque lot de souris, en expérience, a donc reçu une injection d'une fraction subcellulaire, soit de la tumeur, soit des tissus sains.

Quatre semaines après l'inoculation, la tumeur a été transplantée sur chaque souris par voie sous cutanée à raison de 1.000.000 de cellules de carcinome mammaire par animal.

Il y avait en parallèle une série d'animaux témoins sains et une série d'animaux témoins n'ayant subi que la transplantation tumorale. MINTON a ensuite établi les pourcentages d'apparition de tumeur et a apprécié leur taille.

Ses résultats sont à peu près identiques pour tous les lots à deux exceptions près.

- Pour les animaux traités au préalable par une injection de mitochondries cancéreuses, il y a un pourcentage très inférieur de développement tumoral par rapport aux autres lots et aux témoins. Le diamètre moyen des tumeurs de ce lot est le plus petit .
- Pour les animaux ayant reçu au préalable une injection de mitochondries normales, il y a une augmentation du pourcentage d'apparition de la tumeur. Leur diamètre moyen est le plus important.

MINTON conclut son étude en indiquant simplement qu'il y a une différence entre les deux types de mitochondries.

- 2 - Les travaux de KRUGER se rapportent indirectement à notre travail, en ce sens que la tumeur utilisée est un sarcome induit par le méthylcholanthrène chez la souris de la lignée C_3H/He .

KRUGER qui a fait appel aux techniques immuno électrophorétiques signale une différence dans le comportement des protéines des mitochondries et l'apparition d'une nouvelle protéine probablement spécifique de tumeur, peut être apparentée aux composants protéiques de la fraction mitochondriale.

- 3 - Les travaux de PONTIERI sont encore différents des précédents mais rejoignent néanmoins notre sujet. Ils se rapportent à la tumeur mammaire de la souris R III qui renferme le facteur lacté ou facteur de BITTNER.

L'étude immunologique faite concerne la présence dans les fractions subcellulaires d'un antigène supplémentaire dans le tissu tumoral, qui n'existe pas dans les glandes mammaires saines de la lignée $C_{57}Bl$. Cet antigène peut être décelé au moyen d'un immun-sérum de lapin obtenu par injection du lait de souris R III renfermant l'agent de BITTNER. PONTIERI a en outre essayé d'isoler et de caractériser cet antigène qu'il croit être un complexe glucido protidique.

- 4 - Les travaux de GRAFFI sont à notre avis très importants . Cet Auteur émet "la théorie mitochondriale de la cancérogénèse".

Il a pu montrer, grâce à la microscopie en fluorescence, que les composés fortement cancérogènes comme le benzopyrène ou le méthylcholanthrène se propagent dans les cellules en commençant par le cytoplasme, notamment les mitochondries, les lysosomes, le reticulum endoplasmique bien avant d'atteindre le noyau de la cellule. Il en a conclu que la transformation de la cellule normale en cellule néoplasique peut être due à une mutation des constituants cytoplasmiques sans que le matériel génétique nucléaire soit touché. Les premiers éléments cytoplasmiques ayant retenu son attention sont les mitochondries.

A cette époque, on ignorait la présence d'ADN dans les mitochondries et l'autoreplication possible de ces organites.

Ces dernières années, la situation s'est considérablement éclaircie depuis que l'on sait que les mitochondries renferment un ADN spécial et qu'elles sont susceptibles de synthétiser les protéines à partir d'un ADN et d'un ARN mitochondrial. Un récent article de WAGNER (93) et un autre de ANDRE (3) font le point sur ce sujet d'actualité. Ils rappellent notamment la possibilité pour les mitochondries d'être le siège de mutations et la forme différente de l'ADN mitochondrial par rapport à la forme de l'ADN chromosomal .

C'est à partir de ces notions que GRAFFI a émis la théorie mitochondriale de la cancérisation selon laquelle le premier élément touché dans la cancérogenèse est le matériel mitochondrial.

D'après cet auteur :

" Ce qui semble important, c'est de chercher les différences entre les mitochondries normales et tumorales, notamment dans le domaine des réactions biochimiques qui présentent d'étroites relations avec les fonctions génétiques , car toutes ces réactions sont contrôlées par l'ADN " .

GRAFFI et ses collaborateurs (35) ont donc réalisé des expériences biochimiques portant sur :

- la Synthèse des protéines
- la Synthèses des lipides
- le contenu en ADN des mitochondries de différentes tumeurs de souris, dont le carcinome mammaire de la souris C₃H, de différents tissus sains (foie, coeur, reins) et enfin de différents tissus à croissance rapide (tissu embryonnaire, placenta, rate).

Les conclusions de GRAFFI ne font que renforcer l'hypothèse énoncée plus haut à savoir que les organites les premiers atteints par le processus cancérigène sont les mitochondries qui peuvent

éventuellement faire l'objet d'une mutation. Il ne serait pas alors impossible de supposer que la transformation maligne de la cellule soit due à une altération primaire des mitochondries.

GRAFFI ne donne pas plus de précision sur ce mécanisme qui devrait recevoir un début d'éclaircissement dans les années à venir.

CONCLUSION

L'étude comparative chimique et immunologique des mitochondries isolées de la tumeur mammaire et du tissu sain homologue, à laquelle nous nous sommes livré, nous a permis de faire les constatations suivantes :

- il n'y a aucune différence morphologique à l'examen au microscope électronique en coloration négative et après inclusions et coupes.
- une différence électrophorétique est décelée lorsque l'agent tensio actif utilisé pour rompre les membranes et solubiliser les protéines est le dodécylsulfate de sodium
- cette différence est confirmée par la mise en oeuvre des techniques immunologiques .

o
o o

La différence constatée provient-elle de la membrane ou du contenu mitochondrial ? Telle est la première question qui vient à l'esprit.

La nature de la membrane mitochondriale est connue. Elle est constituée de deux feuilletts protéiques englobant une couche lipidique. Ces protéines et lipoprotéines de constitution n'ont pas les mêmes propriétés que les protéines ou les enzymes du contenu mitochondrial. Elles sont responsables des phénomènes de membrane, c'est-à-dire :

- des phénomènes contractiles

et

- des phénomènes osmotiques,

qui se produisent au niveau des mitochondries .

En fait, la membrane mitochondriale possède les mêmes propriétés

et la même constitution que la membrane cellulaire.

Le contenu protéique mitochondrial peut être divisé en trois catégories :

- Les protéines des systèmes enzymatiques.
- Les protéines synthétisées , in situ, autres que les protéines des systèmes enzymatiques.
- Les nucléoprotéines .

Ce contenu joue un rôle non négligeable dans le contrôle du fonctionnement des mitochondries . Un processus d'auto-régulation métabolique repose sur la plus ou moins grande quantité d'ADP présent. En effet, l'addition d'ADP à des mitochondries isolées provoque toujours l'augmentation du transfert électronique à partir des substrats disponibles et par simple conséquence l'augmentation de la consommation en oxygène (CHANCE - 1963 (20)).

Les nucléoprotéines présentes, ADN et ARN, permettent à la mitochondrie d'avoir une certaine indépendance au sein de la cellule. Son ADN lui permet de se répliquer et avec l'aide de l'ARN présent, de synthétiser, in situ, un certain nombre de protéines, sans avoir besoin de faire appel au matériel génétique nucléaire .

Comment situer la différence relevée dans nos expériences ?

Nous avons souligné dans la première partie que la fraction protéique dédoublée est très "particulière" . Les bandes obtenues à l'électrophorèse laissent à penser qu'il s'agit vraisemblablement davantage d'une protéine de constitution que d'une protéine du contenu mitochondrial. Il pourrait donc s'agir d'une fraction protéique de la membrane mitochondriale; on sait, en effet, que les agents tensio-actifs utilisés (18) solubilisent une bonne partie de celle-ci

L'antigène supplémentaire trouvé, est-il un antigène spécifique de cancer ?

C'est la seconde question que l'on peut se poser .

o
o o

HADDOW (37) dans sa mise au point sur les antigènes spécifiques de cancer parle du double paradoxe immunologique de la cellule tumorale .

Le premier paradoxe est fondé sur l'hétérogénéité des faits expérimentaux obtenus in vitro. Dans certains cas, la cancérisation aboutit à une simplification antigénique du contenu cellulaire, dans d'autres, elle entraîne le phénomène inverse , c'est à dire l'apparition d'antigènes nouveaux, n'existant pas dans le tissu sain homologue.

Le second paradoxe réside sur les réponses de l'hôte à la tumeur.

Pourquoi, dans l'hypothèse où une tumeur donnée possède un antigène spécifique de cancer, l'hôte ne réagit-il pas plus souvent contre lui ?

Le problème ainsi soulevé a donné lieu à de nombreux travaux, qui rejoignent ceux de FURTH , dont nous avons parlé au commencement de notre étude (32) .

A l'heure actuelle, aucune solution vraiment satisfaisante ne paraît avoir été trouvée. Cependant, un début d'éclaircissement est apparu au cours des dernières années. Il semble que dans tous les cas étudiés, il existe une réponse immunologique de la part de l'hôte . Mais cette réponse, si elle est suffisante dans certains cas pour éliminer les cellules anormales, ne suffit plus dans d'autres, et les cellules tumorales ne sont plus détruites par le processus immunologique.

La thérapeutique d'un certain nombre de cancers est fondée sur le principe de cette réponse .

Le système immunologique compétent est contraint à fabriquer des anticorps par l'injection à l'individu porteur d'un cancer, d'une substance fortement antigénique. Les injections de B.C.G. à certains malades sont faites dans ce but .

Deux conditions au moins doivent , à notre avis, être réunies pour permettre d'affirmer qu'il s'agit d'un antigène spécifique de cancer :

- 1°) Il faut trouver dans le tissu tumoral une substance antigénique qui ne se retrouve pas dans le tissu sain homologue.
- 2°) Il faut que cette substance tumorale provoque, de la part de l'hôte, une réponse immunitaire spécifique.

Dans notre étude, si ces deux critères sont retenus, l'affirmation de l'existence d'un antigène spécifique de cancer ne peut être faite, car la seconde condition n'est pas remplie. Nous avons bien noté une différence antigénique, mais nous n'avons pas retrouvé de réponse immunologique spécifique de la part de souris ayant subi la transplantation tumorale, lorsque le sérum de ces souris est mis en présence de nos extraits antigéniques. Nous aurions peut-être dû utiliser, non pas un sérum de souris ayant reçu la greffe de la tumeur, mais un sérum de souris portant spontanément la tumeur.

o
o o

Le processus même de la cancérisation fait l'objet d'une nouvelle question :

La différence constatée est-elle la cause ou seulement l'un des effets de la transformation ?

La réponse à cette question ne peut être faite qu'après avoir envisagé les deux possibilités.

La présence d'un antigène supplémentaire au niveau mitochondrial apporte à l'hypothèse de GRAFFI (35) une confirmation qui est loin d'être décisive. Si GRAFFI a pu mettre en évidence que les premiers organites touchés par les substances cancérigènes sont les mitochondries, il n'est pas encore prouvé que l'atteinte mitochondriale est la lésion primaire qui déclenche le processus tumoral. Une telle hypothèse, pour être admise, exigerait que le "gène de régulation cellulaire" soit situé au niveau mitochondrial. On sait que les mitochondries possèdent un ADN dont la taille et la forme rappellent les ADN viraux ; on sait aussi que cet ADN a des rapports étroits avec le noyau, mais ces éléments sont insuffisants pour "porter le diagnostic" .

Il est beaucoup plus logique d'admettre que les résultats obtenus ne sont qu'une conséquence du passage de l'agent cancérigène dans la cellule. Qu'il s'agisse d'un agent physique, chimique ou viral, et que le résultat du passage soit une destruction partielle, totale, ou une simple substitution, on doit aboutir à une modification du contenu cellulaire et plus précisément, au plan qui nous occupe à une modification du contenu mitochondrial .

o
o o

Quel doit-être alors la voie à suivre ?

Les derniers travaux sur le processus cancérigène analysent les modifications de la membrane cellulaire.

L'hypothèse selon laquelle le comportement tumoral d'une cellule serait lié à des modifications de sa membrane est déjà ancienne. Cependant divers résultats expérimentaux récents, mettant en évidence des anomalies de la surface des cellules tumorales étudiées in vitro, sont venus la renforcer singulièrement, si bien que l'on tend de plus en plus à chercher le point de départ du processus tumoral au niveau de la membrane cellulaire. C'est ainsi qu' ABERCROMBIE a pu

montrer que les cellules tumorales avaient perdu "l'inhibition de contact" et que WEISS a observé que la membrane de la cellule tumorale avait une mobilité électrophorétique anormale. De nombreuses autres expériences ont été faites, et toutes les conclusions sont les mêmes : La membrane cellulaire est fortement modifiée au cours des néoplasmes.

Si la différence trouvée dans notre étude porte sur une fraction protéique de la membrane mitochondriale, comme nous le supposons, il est vraisemblable que la même différence se retrouve au niveau de la membrane cellulaire. Mais l'étude de la membrane cellulaire sur un fragment tumoral n'est pas facile, aussi avons-nous été incité à mettre notre tumeur en culture, car la membrane cellulaire peut être facilement obtenue à partir des cellules en culture. Nous sommes arrivé à obtenir une très bonne primo-culture, mais les repiquages se font mal. C'est pourquoi actuellement, nous essayons de sélectionner les cellules viables in vitro en passant plusieurs fois de suite de la primo-culture à l'animal.

L'étape suivante de notre travail consistera dans l'étude immunologique de la membrane cellulaire. Cette étude sera conduite de façon à retrouver, si possible, à ce niveau, les mêmes différences que celles observées au niveau des mitochondries.

o
o o

L'étude d'un tel sujet ne peut être close sans rappeler le problème fondamental posé par l'agent de BITTNER et les virus oncogènes à ARN. Jusqu'à ces dernières années, on ne comprenait pas comment un virus à ARN pouvait être responsable de la cancérisation car on ne voyait pas comment un ARN pouvait s'intégrer au génome cellulaire. Mais TEMIN a récemment donné la solution de cette énigme par la découverte d'une enzyme capable de transcrire un ADN

à partir d'un ARN . Cette enzyme est une ADN polymérase ARN dépendante.

Un grand pas a été franchi dans les connaissances intimes du processus tumoral. Il faut cependant formuler des voeux pour que les connaissances acquises , fruits des travaux et des recherches de tous, permettent dans un avenir très prochain la découverte de médicaments vraiment spécifiques du cancer. L'espoir renaîtra alors au coeur des victimes de cette grave maladie.

o

o o

B I B L I O G R A P H I E

- (1) - AISENBERG A.C.
Studies on normal and neoplastic mitochondria: Respiration and phosphorylation.
Cancer Res. 1961 , 21 , n°3 , p. 295 - 308
- (2) - d'AMELIO V. , MUTOLO V. , BARBARINO A.
Immunological and electrophoretic analysis of rat liver mitochondria and other cellular fractions .
Exp.Cell.Res. 1963 , 29 , p. 1 - 16
- (3) - ANDRE J.
Données récentes sur la physiologie des mitochondries.
C.R.Soc.Biol.(Orsay) 1968 , 162 , n°1 , p. 7 - 12
- (4) - ANSON M.L.
Denaturation of proteins by synthetic detergents and bile salts.
J. Gen. Physiol. 1939 , 23 , p. 239 - 241
- (5) - APOLANT H.
Die epithelialen Geschwulste der Maus.
Arb. Königl. Inst. Exp. Ther. 1906 , 1 , p. 7 - 62
- (6) - BARCH S. H.
Comparison of antigenic components in normal and neoplastic tissues.
Exp. Cell. Res. 1962 , 27 ; p. 548 - 552
- (7) - BARGMANN W. , FLEISCHAUER K. ; KNOOP A.
Über die Morphologie der Milchsekretion. II Zugleich eine Kritik am Schema der Sekretionsmorphologie.
Z. Zellforsch. 1961 , 53 , p. 545 - 568

- (8) - BARRON E. J. , HANAHAN D. J.
Observations on the silicic acid chromatography of the neutral lipids
of rat liver , beef liver , and yeast.
J. Biol. Chem. 1958 , 231 , p. 493 - 503
- (9) - BENSLEY R.R.
Morphological components of the cytoplasm.
Anat. Record. 1937 , 69 , p. 341 - 351
- (10) - BERNHARD W.
The detection and study of tumor viruses with the electron microscope.
Cancer Res. 1960 , 20 , p. 712- 727
- (11) - BITTNER J. J.
Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence
in mice.
Science 1936 , 84 , p. 162 - 164
- (12) - BITTNER J. J.
Host-induced changes in the mouse mammary tumor agent from transplanted
tumors as determined by neutralization studies.
Cancer Res. 1959 , 19 , P. 918 - 926
- (13) - BLAIR P. B.
The mammary tumor virus.
Curr. Top. Microb. 1968 , 45 , p. 1 - 68
- (14) - BOURLIOUX P. , TRAN BA LOC P.
Différence entre les mitochondries des glandes mammaires de souris C3H
et de celles du carcinome mammaire greffé de même lignée.
C. R. Soc. Biol. 1967 , 161 , n° 3 , p. 502 - 507
- (15) - BOWYIER D.E. , LEAT V.M.P. , HOWARD A.N. , GRESHAM G.A.
The determination of the fatty acid composition of serum lipids separated
by thin layer chromatography, and a comparison with column chromatography.
Biochim. Biophys. Acta 1963 , 70 , p. 423 - 431

- (16) - BREW K. , CAMPBELL E. .
Studies on the biosynthesis of protein by lactating guinea pig
mammary gland.
Biochem. J. 1967 , 102 , p. 265 - 274
- (17) - BROWN E.R. , BITTNER J.J.
Fluorescent antibody reaction against the mouse mammary tumor agent.
Proc. Soc. Exp. Biol. 1961 , 106 , p. 303 - 306
- (18) - BURKHART R.K. , KROPF G.
Solubilization of mitochondrial proteins.
Biochim. Biophys. Acta 1964 , 90 , p. 393 - 396
- (19) - BUTOW R.A. , NELSON W.L.
Respiration control in guinea pig mammary gland mitochondria.
Biochim. Biophys. Acta 1964 , 92 , p. 166 - 168
- (20) - CHANCE B.
in "Energy - linked function of mitochondria"
First colloquium of the Johnson Research Foundation 1963
Academic press . N.Y.
- (21) - CLAUDE A.
Isolation of cellular components by a high speed centrifugation
Science 1939 , 90 , p. 213 - 214
- (22) - CLAUDE A.
Particulate components of normal and tumor cells.
Science 1940 , 91 , p. 77 - 78
- (23) - CLAUDE A.
The constitution of protoplasm.
Science 1943 , 97 , p. 451 - 456

(24) - CONGIU L.

Electrophorèse libre des protéines de mitochondries de foie de rat normal et de rat engraissé.

G. Biochim. 1959 , 8 , p. 261 - 265

(25) - CRASTES DE PAULETS A. , CRASTES DE PAULETS P. , THALER DAO

Analyse et détermination quantitative des phospholipides plasmatiques par chromatographie sur couche mince, et photodensitométrie indirecte.

Ann. Biol. Clin. 1967 , 25 , n° 5-6 , p. 627 - 644

(26) - DUNN T.B.

Morphology of mammary tumors in mice.

in " The physiopathology of cancer " 1953 , p. 123 - 184

F. Homburger and W.H. Fishmann Edit. N.Y. Hoeber Inc.

(27) - EMMELOT P.

Long-chain fatty acids in rat hepatoma homogenates and the properties of hepatoma mitochondria.

Cancer Res. 1962 , 22 , p. 38 - 48

(28) - ERNSTER L. , DRAHOTA Z.

Mitochondria : structure and function.

Proceedings of the fifth meeting of the federation of european biochemical society. Pragen 1968 . Academic Press N.Y.

(29) - FOLCH J. , LEES M. , SLOANSTANLEY G.H.

A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.

J. Biol. Chem. 1957 , 226 , p. 497 - 509

(30) - FOSTER J.F. , YANG J.T.

On the mode of interaction of surface active cations with ovalbumin and bovin plasma albumin

J. Am. Chem. Soc. 1954 , 76 , p. 1015 -1018

- (31) - FOX S.W. , FOSTER J.F.
in " Introduction to protein chemistry "
J. Wiley and sons Inc. (N.Y.) 1957 , p. 250 - 252 et p. 313.
- (32) - FURTH J. , CLIFTON K.H.
Experimental observations on mammotropes and the mammary gland.
in " Endocrin aspects of breast cancer " A.R. Currie Edit.
1957 , p. 276 - 282
- (33) - GETZ G.S. , BARTLEY W.
The intracellular distribution of fatty acids in rat liver: the fatty
acids of intracellular compartments.
Biochem. J. 1961 , 78 , p. 307 - 312
- (34) - GETZ G.S. , BARTLEY W. , STIRPE F. , NOTTON B.M. , RENSHAM A.
The lipid composition of rat liver mitochondria , fluffy layer , and
microsomes.
Biochem. J. 1962 , 83 , p. 181 - 186
- (35) - GRAFFI A.
Studies on the problem of the importance of mitochondria in carcino-
genesis.
D. Deutche. Gesund. 1967 - 49 - p. 2305-2312
- (36) - GRAFFI A. , BUTSCHAK G. , SCHNEIDER E.J.
Differences of mitochondrial protein synthesis in vitro between tumor
and normal tissue.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1965 , 21 , p. 418 - 423
- (37) - HADDOW A.
Immunology of the cancer cell : tumor specific antigens.
Brit. Med. Bull. 1965 , 21 , p. 133 - 139
- (38) - HAGUWARA K.
Round table conference. Discourses on the subject of mitochondria.
Protein (Tokyo) 1965 , 10 , p. 1241 - 1276

- (39) - HANAHAN D.J. , DITTMER J.C. , WARASHINA E.
Acolumn chromatographic separation of classes of phospholipids.
J. Biol. Chem. 1957 , 228 , p. 685 - 700
- (40) - HAREL L., JACOB A. , MOULE Y.
Fractionnement des protéines mitochondriales .
Bull. Soc. Chim. Biol. 1957 , 39 , p. 819 - 821
- (41) - HAWTREY A.O. , SILK M.H.
Mitochondria of the Ehrlich ascites tumor: swelling characteristics.
Brit. J. Cancer 1959 , 13 , p. 566 - 569
- (42) - HOGEBOOM G.H. , SCHNEIDER W.C.
Protein of liver and hepatoma mitochondria.
Science 1951 , 113 , p. 355
- (43) - HOGEBOOM G.H. , SCHNEIDER W.C. , PALLADE G.E.
The isolation of morphologically intact mitochondria from rat liver.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1947 , 65 , p. 320 - 321
- (44) - HOKO T.
Immunochemical analysis of mitochondrial fraction from cancer cells.
Juzen Igaku Zasshi 1966 , 74 , n° 1 , p. 30 - 31
- (45) - HOLLMANN K.H.
L'ultrastructure de la glande mammaire normale de la souris en état de lactation.
J. Ultrastructure Res. 1959 , 2 , p. 423 - 443
- 46) - HOLLMANN K.H.
A morphometric study of sub-cellular organization in mouse mammary cancer and normal lactating tissue.
Z. Zellforsch. 1968 , 87 , p. 266 - 277
- (47) - HORN E.C.
Ascites tumor development : I. An analysis of in vivo effect of nucleoprotein from Ehrlich ascites cells.
Cancer Res. 1955 , 15 , P. 663 - 670

- (55) - KOSAKI T. , NAKAGAWA S. , SAKA T. , KOTANI K.
On malignolipin (part IV,V,VI)
Proc. Jap. Acad. 1960 , 36 , p. 362-371
- (56) - KROHN J.
Cellulose acetate electrophoresis and immunodiffusion techniques.
in "Chromatographic and electrophoretic techniques".
Ivor Smith Ed. Interscience N.Y.
- (57) - KRUGER G.
Further studies on the antigen composition of a mouse sarcoma.
Z. Krebsforsch. 1969 , 73 , p. 164-171
- (58) - LACCASSAGNE A.
Apparition de cancers de la mammelle chez la souris mâle soumise à des injections de folliculine.
C. R. Acad. Sci. 1932 , 195 , p. 630 - 632
- (59) - LACASSAGNE A. , CHAMORRO A.
Conséquences de l'hypophysectomie chez des souris sujettes au carcinome mammaire, traitées par l'hormone oestrogène.
C. R. Acad. Sci. 1939 , 231 , p. 1077 - 1078
- (60) - LASFARGUES E.Y.
Cultivation and behavior in vitro of the normal mammary epithelium of the adult mouse.
Anat. Rec. 1957 , 127 , n° 1 , p. 117 - 125
- (61) - LASFARGUES E.Y. , FELDMANN D.G.
Hormonal and physiological background in the production of B particles by the mouse mammary epithelium , in organ culture.
Cancer Res. 1963 , 23 , p. 191 - 196
- (62) - LEHNINGER A.L, ALBERT L.
The mitochondrion : molecular basis of structure and function.
W.A. Benjamin Inc. N.Y. 1964

- (63) - LUNDGREEN H.P. , ELAM D.W. , O'CONNELL R.A.
Electrophoretic study of the action of alkyl benzene sulfonate detergents on egg albumin.
J. Biol. Chem. 1943 , 149 , p. 183 - 186
- (64) - LYONS M.J. , MOORE D.H.
Further studies on the chemical characterization of the mammary tumor virus.
in "Cellular control mechanisms and cancer".
Elsevier Publishing Company . Amsterdam 1964 ,p. 361 - 364
- (65) - MAC FARLANE M.G. , GRAY G.M. , WHEELDON L.W.
Fatty acid composition of phospholipids from subcellular particles of rat liver.
Biochem. J. 1960 , 77 , p. 626 - 631
- (66) - MANDL L. , MAC LENAN M. , HOWER J.F.
Isolation and characterisation of proteinase and collagenase from *Clostridium histolyticum*.
J. Clin. Invest. 1953 , 32 , p. 1323 - 1329
- (67) - MINTON J.P.
Effect of immunization with subcellular fraction , on tumor growth in C3H/HeN mice.
Surg. Forum 1968 , 19 , p. 91 - 93
- (68) - MOLLENHAUER H.H.
Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy.
Stain. Techn. 1964 , 39 , p. 111 - 114
- (69) - MOORE D.H. , LASFARGUES E.Y. , MURRAY M.R. , HAAGENSEN C.D. , POLLARD E.
Correlation of physical and biological properties of mouse mammary tumor agent.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 1959 , 5 , p. 85 - 92
- (70) - MORTON R.K.
Separation and purification of enzymes associated with soluble proteins.
Nature 1950 , 166 , p. 1092 - 1093

- (71) - NAIRN R.C. , FOTHERGILL J.E. , Mc ENTERTON M.G.
Loss of gastro intestinal specific antigens in neoplasms.
Brit. Med. J. 1962 , 1 , p. 1791 - 1799
- (72) - Nussbaum J.L. , MANDEL P.
La distribution des phosphatides dans les gaines de myéline, les mitochondries et les microsomes de cerveau de rats.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1965 , 47 , p. 395 - 408
- (73) - OKAMURA N. , SATO K.
Detection of malignolipin in human venous blood and in experimental tumor cell.
Sci. Rep. Res. Inst. (Tohoku Univ.) 1961 , 10 , p. 274 - 280
- (74) - OUCHTERLONY O.
Antigen-antibody reaction in gels.
Acta pathol. Microbiol. 1949 , 26 , p. 507 - 515
- (75) - PALLANESCH M. , BRIGGS D.
A study of the interaction of dodecyl sulfate with bovin serum albumin.
J. Am. Chem. Soc. 1954 , 76 , p. 1396 - 1399
- (76) - PETER F.
Diplome d'Etudes Pharmaceutiques Spécialisées.
Faculté de Pharmacie . Paris . 1970
- (77) - PIKOWSKI M.A.
The survival of the mammary tumor milk agent in culture of heterologous host.
J. Nat. Cancer Inst. 1953 , 13 , p 1275 - 1282
- (78) - PONTIERI G.M. , BIANCO A. , PLESCIA O.J.
Antigens of spontaneous mouse mammary tumor tissue.
Giorn. Microbiol. 1962 , 10 , p. 117 - 127

- (79) - POTTER V.L. , ELVEHJEM C.A.
A modified method for the study of tissue oxidations.
J. Biol. Chem. 1936 , 114 , p. 495 - 504
- (80) - PULLMANN E.M. , PENEFSKY H.S.
in "Methods in Enzymology"
1963 , VI , p. 280 - 281
- (81) - RAPPORT M.M. , GRAF L.
Extraction of complement fixing lipid antigens from mitochondria of
Murphy - Sturn lymphosarcoma.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 1954 , 1 , p. 39-45
- (82) - REYNOLDS E.S.
Lead citrate staining techniques.
J. Cell. Biol. 1963 , 17 , p. 208 - 213
- (83) - SARACINO R. , RANCILLAC O. , GABAY P. , BOURDIN J.S.
Intérêt du dosage de la Malignolipine dans le diagnostic des néoplasies
malignes.
C. R. Acad. Sci. 1965 , 261 , p. 1789 - 1792
- (84) - SINGH V.H. , RAGHUPATHY E.S. , CHAIKOFF I.L.
Incorporation of amino-acid carbon into proteins by sheep thyroid gland
mitochondria.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1964 , 16 , n° 1 , p 12 - 18
- (85) - SMITH S. , DILS R.
Factors effecting the chain lenght of fatty acids synthetised by
lactating rabbit mammary glands.
Biochim. Biophys. Acta 1964 , 84 , p. 776 - 778
- (86) - SMITH S. , EASTER D.J. , DILS R.
Fatty acid biosynthesis. III. Intracellular site of enzyme in lactating
rabbit mammary gland.
Biochim. Biophys. Acta 1966 , 125 , p. 445 - 455

(87) - TAKAYANAKI N.

Study on the extracts from D.A.B. hepatoma of rat by immunodiffusion techniques.

The Jahresbericht des Kurashiki Zentralhospital 1964 , 33 , p. 190-193

(88) - TAKEDA K. , YOSHIO H. , SAKATA Y.

Immunopathological studies on the specificity of the tumor antigen of rat treated with T.C.A.

Gann 1956 , 47 , P . 549 - 550

(89) -TIMASHEFF S. , NORD F.

Interaction of egg albumin with dodecylamine hydrochloride.

Arch. Biochem. Biophys.

1951 , 31 , p 309 - 311

(90) - UGAZIO G.

Paper electrophoresis of soluble proteins of rat liver mitochondria.

Experientia 1960 , 16 , p. 349 - 350

(91) - VEERKAMP J.H. , MULDER I. , VAN DEENEN L.M.

Comparison of the fatty acid composition of lipids from different animal tissues including some tumors.

Biochim. Biophys. Acta 1962 , 57 , p. 299 - 309

(92) - WADKINS C.L. , LEHNINGER A.L.

in "Methods in Enzymology".

1963 , VI , p. 265 - 266

(93) - WAGNER R.P.

Genetics and Phenogenetics of mitochondria.

Science 1969 , 163 , n° 3871 , p. 1026 - 1031

(94) - WAKABAYASHI A.

Immunological studies on the membrane systems of cancer cells.

I. Immunochemical analysis of membrane fractions from cancer cells.

Acta Med. Okayama 1968 , 22 , p. 47 - 60

- (95) - WAKABAYASHI A.
Immunological studies on the membrane systems of cancer cells.
II . Immunochemical specificity of the mitochondria from chemical
carcinogen-induced carcinoma cells.
Acta Med. Okayama 1969 , 23 , p. 47- 69
- (96) - WEILER E.
Bei Änderung der Serologischen Organspezifität beim Buttergelb-tumor der
Ratte im Vergleich zu normaler Leber.
Z. Naturforsch. 1952 , 7 , p. 324 - 326
- (97) - WELLINGS S.R. , DE OME K.B. , PITELKA D.R.
Electron microscopy of milk secretion in the mammary gland of the
C3H/Crgl mouse.
I. Cytomorphology of the prelactating and the lactating gland.
J. Nat. Cancer Inst. 1960 , 25 , p. 393 - 421
- (98) - WERKEISER W.C. , BARTLEY W.
The study of steady state concentrations of internal solutes of
mitochondria by rapid centrifugal transfer to a fixation medium.
Biochem. J. 1957 , 66 , p. 79 - 91
- (99) - WITTER R.F. , COTTONE M.A.
A study of some factors involved in the swelling of isolated mitochondria.
Biochim. Biophys. Acta 1956 , 22, p. 364 - 371
- (100) - YANG J. , FOSTER J.F.
Statistical and all or none binding of alkylbenzene sulfonate by albumin.
J. Am. Chem. Soc. 1953 , 75 , p. 55 - 60
- (101) - ZILBER L.A.
Specific tumor antigens.
Advance Cancer Res. 1958 - 5 - p. 291 - 295

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>PREMIERE PARTIE</u> : Extraction des mitochondries de la tumeur mammaire et des glandes mammaires normales	10
A - Introduction	11
B - Extraction des mitochondries : généralités	17
I - Les mitochondries provenant de la tumeur	18
1 - La tumeur mammaire	18
a - Méthode de greffe de la tumeur	19
b - Développement de la tumeur greffée	19
c - Conservation de la tumeur	19
d - Homogénéisation de la tumeur	20
2 - Obtention des mitochondries provenant de la tumeur	21
a - Première technique utilisable	22
b - Deuxième technique utilisable	22
c - Technique utilisée	22
II - Les mitochondries provenant des glandes mammaires	23
1 - Les glandes mammaires	23
a - Les souris	23
b - Le prélèvement	24
c - L'homogénéisation.....	24
2 - Obtention des mitochondries des glandes mammaires	26
a - La première technique utilisée	26
b - La meilleure technique	26
C - Résultats obtenus avec les techniques utilisées	30
D - Contrôle en microscopie électronique	31
I - Technique de coloration négative	31
1 - Technique utilisée	31
2 - Résultats obtenus	32
II - Technique après inclusion et coupe	33
1 - Technique utilisée	33
2 - Résultats obtenus	34

E - Conclusions de la Première partie	35
<u>DEUXIEME PARTIE</u> : Etude comparative du contenu protéique et lipidique des mitochondries isolées	
	36
<u>CHAPITRE I</u> : ETUDE CHIMIQUE ET ELECTROPHORETIQUE DU CONTENU PROTEIQUE MITOCHONDRIAL	
	37
A - Introduction	37
B - Méthode de rupture des membranes et de solubilisation des protéines	39
I - Les procédés utilisables	39
II - Le procédé utilisé	41
C - Dosage des protéines mitochondriales	42
I - Mode opératoire pour le surnageant	42
1 - Courbe d'étalonnage	43
2 - Dosage des protéines du surnageant	43
II - Mode opératoire pour le Culot	44
III- Les résultats	44
IV - Discussion des résultats	45
D - Etude électrophorétique comparée des protéines de mitochondries normales et tumorales	46
I - Protocole opératoire	46
1 - Matériel	46
2 - Méthode	47
II - Résultats obtenus	48
III- Discussion des résultats.....	50
E - Conclusion du Chapitre I	53
<u>CHAPITRE II</u> : ETUDE CHIMIQUE ET CHROMATOGRAPHIQUE DU CONTENU LIPIDIQUE MITOCHONDRIAL	
	54
A - Introduction	54
B - Protocole général d'étude	56
I - Méthode d'extraction	56
II - Méthode de fractionnement	57
1 - La chromatographie sur colonnes	58

2 - La chromatographie sur couches minces	59
a) Principe	59
b) Préparation des plaques	59
c) Chromatographie proprement dite	61
d) Révélation des composés lipidiques	63
C - Résultats obtenus	65
I - Concernant le taux des lipides totaux	65
II- Concernant le fractionnement des lipides	65
1 - Différents types de lipides neutres	66
2 - Différents types de phospholipides	67
D - Discussion des résultats	69
E - Conclusion du Chapitre II	72

TROISIEME PARTIE : Etude immunologique comparée des mitochondries isolées de la tumeur mammaire et des glandes mammaires saines

.....	74
A - Introduction	75
B - Première série d'essais	76
I - Matériel et méthodes	76
1 - Préparation des Antigènes	76
2 - Inoculation au lapin et contrôle	77
a) Principe.....	78
b) essai préliminaire	79
c) Technique définitive	80
II - Résultats obtenus	80
1 - Premier groupe de résultats	80
2 - Deuxième groupe de résultats	82
3 - Troisième groupe de résultats	84
4 - quatrième groupe de résultats	85
III - Discussion des Résultats	85
IV - Conclusion des Essais	87
C - Deuxième série d'essais	91
I - Matériel et méthodes	91
1 - Les Antigènes	91
2 - Inoculation au lapin et contrôle.....	91
3 - Méthodes immunologiques	92

II - Résultats et Discussion	93
1 - Premier groupe de résultats.....	93
a) Résultats	93
b) Signification	94
2 - Deuxième groupe de résultats	95
a) Résultats	95
b) Signification	96
3 - Troisième groupe de résultats	96
III - Discussion des résultats	97
1 - Avant - Propos	97
2 - Problème immunologique posé par les mitochondries..	98
a) Travaux généraux	98
b) Le tissu tumoral mammaire	99
1 - Travaux de Minton	100
2 - Travaux de Kruger	101
3 - Travaux de Pontieri	101
4 - Travaux de Graffi	101
CONCLUSION	104
Bibliographie	111
Table des Matières	124

et permis d'imprimer,

Paris, le 10 Mars 1971

Pour le Président de l'Université

Le Vice Président

Directeur de l'U.E.R. des
Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de
Paris I

P. Lillemann,

LBA-2

